

Einfluss von Alterationen des Wnt-/ β -Catenin-Signalwegs
auf die Karzinogenese des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Christian Eyrich

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Bedke

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Stehle

Inhalt

| | |
|--|------------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | III |
| 1. EINLEITUNG..... | 1 |
| 1.1 Das Nierenzellkarzinom | 1 |
| 1.1.1 Epidemiologie | 1 |
| 1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren | 1 |
| 1.1.3 Histopathologische Einteilung der Neoplasien der Niere | 3 |
| 1.1.4 Metastasen | 4 |
| 1.1.5 Klinik des Nierenzellkarzinoms | 5 |
| 1.1.6 Diagnostik | 6 |
| 1.1.7 Klassifikation nach TNM | 7 |
| 1.1.8 Prognose | 9 |
| 1.1.9 Therapie des Nierenzellkarzinoms | 12 |
| 1.1.9.1 Chirurgische Intervention | 12 |
| 1.1.9.2 Weitere ablativtherapeutische Verfahren | 12 |
| 1.1.9.3 Therapie bei metastasierten Tumoren..... | 13 |
| 1.2 β-Catenin und der Wnt-Signalweg | 18 |
| 1.2.1 β -Catenin | 18 |
| 1.2.2 Der Wnt-Signalweg | 19 |
| 1.2.3 Zusammenhänge zwischen Wnt-Signalweg und Nierenzellkarzinom..... | 21 |
| 1.3 Ziel der Studien..... | 23 |
| 2. MATERIAL UND METHODEN..... | 25 |
| 2.1 Material | 25 |
| 2.1.1 Patientenkollektiv und Datenerhebung | 25 |
| 2.1.2 Untersuchungsmaterial | 28 |
| 2.2 Methoden | 28 |
| 2.2.1 Der Tissue Micro Array (TMA) | 28 |
| 2.2.1.1 Erstellen der Tissue Micro Arrays | 29 |
| 2.2.2 Immunhistochemie (IHC)..... | 32 |
| 2.3 Auswertung | 37 |
| 2.3.1 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen | 37 |
| 2.3.2 Statistische Auswertung | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 3. ERGEBNISSE | 40 |
| 3.1 Eigenschaften des Patientenkollektivs..... | 40 |
| 3.2 Analyse der immunhistochemischen Proteinexpression für Wnt1..... | 41 |
| 3.3 Analyse der immunhistochemischen Proteinexpression für β -Catenin | 45 |
| 3.3.1 Membranöse β -Catenin-Färbung | 47 |
| 3.3.2 Zytoplasmatische β -Catenin-Färbung | 50 |
| 3.3.3 Nukleäre β -Catenin-Färbung | 53 |
| 3.4 Analyse der Langzeitüberlebensdaten | 53 |
| 3.4.1 Korrelationen von Wnt1 und β -Catenin zu Gesamtüberleben (OS) und krebsspezifischer Überlebensrate (CSS)..... | 53 |
| 3.4.2 Einfluss von Wnt1 und β -Catenin auf prognostische Überlebensdaten | 58 |
| 4. DISKUSSION..... | 61 |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG..... | 73 |
| 6. LITERATURVERZEICHNIS | 75 |
| 7. DANKSAGUNG | 86 |
| 8. LEBENS LAUF | 88 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| ALT | Alanin-Aminotransferase |
| APC | Adenomatöse Polyposis coli |
| AST | Aspartat-Aminotransferase |
| βTrCP | β-Transducin repeat-containing protein |
| CAIX | Carbonic anhydrase IX |
| CARMENA | Clinical Trial to Assess the Importance of Nephrectomy |
| ccRCC | Clear cell RCC |
| chRCC | Chromophobe RCC |
| CI | Konfidenzintervall |
| CK1γ | Casein-Kinase 1γ |
| cm | Zentimeter |
| CREB | cAMP response element-binding protein |
| CRP | C-reaktives Protein |
| CSS | Cancer-Specific-Survival |
| CT | Computertomogramm |
| DFS | Disease-free Survival |
| DKK | Dickkopf-Protein |
| Dsh | Dishevelled |
| EAU | European Association of Urology |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EMT | Epitheliale-mesenchymale Transition |
| FAP | Familiäre adenomatöse Polyposis |
| FDG-PET | Fluordesoxyglukose-PET |

| | |
|--------|--|
| FGI | French Group of Immunotherapy |
| Fz | Frizzled |
| GFR | Glomeruläre Filtrationsrate |
| GSK3 | Glykogensynthase-Kinase 3 |
| Hb | Hämoglobin |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HGFR | Hepatocyte growth factor receptor |
| HIF | Hypoxia inducible factor |
| HIG | Hypoxia inducible protein |
| HR | Hazard Ratio |
| IGFBP4 | Insulin-like growth factor-binding protein |
| IHC | Immunhistochemie |
| IQR | Interquartile range |
| k. A. | Keine Angabe |
| kDa | Kilo Dalton |
| LDH | Laktat-Dehydrogenase |
| Lef | Lymphocyte enhancer factor |
| Lrp | Low-density lipoprotein receptor-related protein |
| m/w | Männlich/weiblich |
| MDCT | Multi Detektor CT |
| mRNA | Messenger RNA |
| MRT | Magnetresonanztomogramm |
| mTOR | Mammalian target of Rapamycin |
| MW | Mittelwert |
| NSAID | Non steroidal antiinflammatory drug |
| NSS | Nephron sparing surgery |

| | |
|--------|--|
| OS | Overall Survival |
| papRCC | Papillary RCC |
| PCP | Planar cell polarity |
| PDGF | Platelet derived growth factor |
| PDGFR | Platelet derived growth factor receptor |
| PET | Positronen Emissionstomogramm |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKD 1 | Proteinkinase D1 |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinasen |
| PTHrP | Parathormon related peptide |
| RAF | Rapidly growing fibrosarcoma |
| RAS | Rat sarcoma |
| RCC | Renal cell carcinoma |
| RFA | Radiofrequenzablation |
| RFS | Recurrence Free Survival |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| SD | Standard-Abweichung |
| sFRP | Secreted Frizzled-related protein |
| siRNA | Small interfering RNA |
| SSIGN | Stage, size, grade, necrosis |
| SPSS | Statistical Package for Social Sciences Software |
| TBE | TRIS, Borat, EDTA |
| TCF | T-cell factor |
| TKI | Tyrosin Kinase Inhibitor |
| TMA | Tissue Micro Array |
| TRIS | Trishydroxymethylaminomethan |

| | |
|-------|---|
| UCLA | University of California, Los Angeles |
| UICC | Union internationale contre le cancer |
| UISS | UCLA integrated staging system |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor |
| VEGFR | Vascular endothelial growth factor receptor |
| VHL | Von-Hippel-Lindau |
| WIF | Wnt inhibitory factor |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

1. Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Nierenzellkarzinom (renal cell carcinoma, RCC) ist ein maligner epithelialer Tumor des Nierengewebes und macht etwa 90% aller primären Nierentumoren aus¹, ca. 7% der Nierentumoren sind benigne Neoplasien².

Die Inzidenz des Nierenzellkarzinoms liegt bei 6,8/100.000 (Frauen) bzw. 16,6/100.000 (Männer), der Anteil der malignen Tumoren der Nieren und der ableitenden Harnwege an allen Malignomneuerkrankungen in Deutschland machte 2006 3,3% (Frauen) bis 4,4% (Männer) aus.³ Für 2012 prognostizierte das Robert-Koch-Institut 9.300 Neuerkrankungen bei Männern, 5.800 bei Frauen.⁴ Tendenziell steigt die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen weltweit jährlich um etwa 2%.⁵ Männer sind bei Diagnosestellung durchschnittlich 68 Jahre alt, Frauen 71 Jahre.⁴

Die 5-Jahres-Prävalenz des Nierenzellkarzinoms lag 2004 in Deutschland bei insgesamt 58.100 Patienten, für das Jahr 2010 prognostiziert das Robert-Koch-Institut eine 5-Jahres-Prävalenz von 63.100 Patienten.⁶

Malignome der Nieren waren 2006 die Ursache für 3,6% (Männer) bzw. 2,7% (Frauen) aller krebsbedingten Todesfälle in Deutschland. Europaweit konnte die Mortalität bis 2004 um 13% (Männer) bzw. 17% (Frauen) gesenkt werden.⁷ Die 5-Jahres-Überlebensrate wird mit 65% bis 75% angegeben.⁶

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Sowohl für das Nierenzellkarzinom als auch für Karzinome des Nierenbeckens bzw. der Ureteren werden Übergewicht, Hypertonie und Tabakkonsum als Risikofaktoren diskutiert.⁸ Raucher haben ein um bis zu 40% erhöhtes Risiko, ein Karzinom der Niere zu entwickeln.⁹ Sowohl langfristige Analgetikaeinnahme¹⁰ als auch Nierensteine, polyzystische Nierenerkrankung⁸ und Dialyse bei Niereninsuffizienz^{11,12} sind als weitere Risikofaktoren zu

nennen; diskutiert werden auch berufliche Belastungen mit Asbest, Lösungsmitteln, Blei oder Cadmium.⁸ Außerdem wurde eine familiäre Disposition beobachtet: Trat in einer Familie ein Nierenzellkarzinom auf, hatten die Nachkommen ein um den Faktor 3,6 erhöhtes Risiko, ebenfalls ein Karzinom zu entwickeln.¹³

Bedeutend für die Ätiologie des klarzelligen Nierenzellkarzinoms (clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) ist eine Mutation bzw. die Inaktivierung des Von-Hippel-Lindau(VHL)-Tumorsuppressor-Genes. Das Von-Hippel-Lindau-Syndrom ist eine Tumorerkrankung mit autosomal-dominantem Erbgang, wobei das auf Chromosom 3, Bande p25/26 liegende VHL-Gen einmal als mutiertes und einmal als Wildtypallel vorhanden ist.¹⁴ Bei den Betroffenen treten Hämangioblastome des ZNS, Hämangiome der Retina, Pankreaszysten, Phäochromozytome, Zystadenome des Nebenhodens sowie Nierenzysten und -karzinome auf.¹⁵ 45% der Patienten mit VHL-Syndrom entwickeln ein klarzelliges Nierenzellkarzinom.²

Bei sporadisch auftretenden klarzelligen Nierenzellkarzinomen findet sich in etwa 50% der Fälle eine Mutation des VHL-Genes und in 10-20% der Fälle ist das VHL-Gen verstärkt methyliert und damit inaktiviert, ohne dass ein VHL-Syndrom vorliegt.¹⁶

Die Funktion des intakten VHL-Tumorsuppressor-Genes besteht in der Regulation des Transkriptionsfaktors hypoxia-inducible factor (HIF), welcher die Transkription des vascular endothelial growth factors (VEGF) und anderer Faktoren des Sauerstoff- und Glukosemetabolismus sowie der Angiogenese aktiviert.¹⁷ Bei inaktiviertem VHL-Gen findet sich ein Überangebot an mRNA, die für oben genannte Faktoren codiert. Dies ist für alle Tumoren des VHL-Syndroms charakteristisch.¹⁸

Für das papilläre Nierenzellkarzinom (papRCC) wurde eine Mutation des c-MET-Protoonkogens nachgewiesen, welches für den Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR) codiert. Durch die resultierende Fehlregulation des ubiquitär vorhandenen HGFR kommt es zu unkontrolliertem Gewebswachstum.¹⁹ Auch eine Keimzellmutation im Gen für die Fumarat-

Hydratase des Zitratzyklus begünstigt das Auftreten von papillären Nierenzellkarzinomen und weiteren Tumoren.^{20,21}

Weiterhin treten bei 45% der Patienten, die unter dem Birt-Hogg-Dubé-Syndrom leiden, Nierentumoren auf.²² Sowohl chromophobe (33%, chRCC) und klarzellige (9%) Nierenzellkarzinome als auch Onkozytome (5%) und chromophob-onkozytäre Mischtumoren (50%) kommen vor.²³ Für das chromophobe Nierenzellkarzinom sind zudem Erbgutveränderungen in den Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13, 17 und 21 als Ursache beschrieben.²⁴

1.1.3 Histopathologische Einteilung der Neoplasien der Niere

Es werden benigne und maligne Tumoren des Nierenparenchyms unterschieden. Zu den benignen Läsionen werden das papilläre Adenom, das Onkozytom und das metanephritische Adenom gezählt. Papilläre Adenome sind die häufigsten gutartigen Neubildungen der Niere und werden meist zufällig diagnostiziert. Onkozytome machen 5% der Nierentumore aus, metanephritische Adenome weniger als 1%.

Die Nierenzellkarzinome werden nach UICC in fünf Gruppen eingeteilt:²⁵

1. Das klarzellige Nierenzellkarzinom ist mit 75 bis 90%⁵ der häufigste maligne Tumor der Niere und entsteht aus den Epithelien des proximalen Tubulus²⁶. Kennzeichnend sind ein klares Zytoplasma, eine gute Vaskularisierung durch ein feines Kapillarnetz und die azinäre oder alveoläre histomorphologische Struktur²⁷ der Tumorzellen. In rund 50% der klarzelligen Nierenzellkarzinome sind Mutationen des VHL-Genes nachweisbar.¹⁶
2. Bei 10 bis 15%⁵ der Nierenzellkarzinome handelt es sich um den papillären (auch chromophilen) Subtyp, der wiederum in Typ-1 (basophile Tumorzellen) und Typ-2 (eosinophile Tumorzellen) unterteilt wird. Typ-2-Tumoren können sich aus Typ-1-Tumoren entwickeln²⁸ und haben eine schlechtere Prognose als Typ-1-Tumoren²⁹. Die papillären Nierenzellkarzinome gehen von den Epithelien des proximalen Tubulus aus und sind mit dysfunktionalen Genen (c-MET-Protoonkogen, Fumarat-Hydratase) assoziiert.²⁶

3. Das chromophobe Nierenzellkarzinom macht 4 bis 5%⁵ der Nierenzellkarzinome aus und geht von den β -intercalated-cells des Sammelrohres aus²⁸, wobei es auch Hinweise auf einen Zusammenhang mit den Zellen des distalen Tubulus³⁰ gibt. Mikroskopisch fallen Halos um die Tumorzellkerne und die Pleomorphie der Tumorzellen auf, deren Zytoplasma sowohl klar als auch eosinophil konfiguriert sein kann. In der Hale-Färbung lässt sich das chromophobe Nierenzellkarzinom kräftig blau anfärben.²⁵
4. Weniger als 1% der Nierenzellkarzinome sind Sammelrohr- bzw. Ductus-Bellini-Karzinome. Sammelrohrkarzinome sind typischerweise aggressive Tumoren, morphologisch sind hochgradig atypische Epithelien in entzündlich verändertem, desmoplastischem Stroma charakteristisch.²⁵
5. In der fünften Gruppe werden Tumoren zusammengefasst, die nicht eindeutig klassifiziert oder charakterisiert werden können.

Für jeden der fünf Subtypen gibt es eine hochmaligne sarkomatoid entdifferenzierte Variante. Sarkomatoid entdifferenzierte Tumoren weisen pleomorph-spindelförmige Tumorzellen auf und haben aufgrund ihres aggressiven Wachstums und rascher Metastasierung eine schlechtere Prognose, auf systemische Chemo- bzw. zielgerichtete Therapien (targeted therapy) sprechen die Tumoren kaum an.^{31,32} Bis zu 13,2% der Nierenzellkarzinome sind sarkomatoid entdifferenzierte Tumoren.³³

1.1.4 Metastasen

Nierenzellkarzinome metastasieren entsprechend dem sogenannten Cava-Typus hauptsächlich pulmonal (50 bis 60% der Fälle mit Metastasen), ossär (30 bis 40%), hepatisch (30 bis 40%) und ins Gehirn (5%). Da viele Nierenzellkarzinome lange Zeit unerkant bleiben und daher oft erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert werden, finden sich bei 25 bis 30% der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Metastasen. Nach Patard et al. weisen von den Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom 21,5% Filiae auf, mit papillärem ca. 15% und mit chromophobem etwa 3%.²⁷ In ca. 90% der

metastasierten Tumoren handelt es sich beim Primarius um ein klarzelliges Nierenzellkarzinom.³⁴ Die Prognose ist trotz chirurgischer und chemotherapeutischer Therapie schlecht: Nur 5 bis 10% der Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen sind fünf Jahre nach Diagnosestellung noch am Leben. Ohne Therapie liegt die mittlere Überlebenszeit bei unter einem Jahr.³⁵ Dank zielgerichteter Therapie (s. u.) werden trotz Metastasen inzwischen mediane Überlebenszeiten von ca. 30 Monaten³⁶ erreicht.

1.1.5 Klinik des Nierenzellkarzinoms

85% der Tumoren werden zufällig bei Ultraschalluntersuchungen oder Computertomogrammen entdeckt, ohne dass beim Patienten spezifische Symptome vorgelegen hatten. Die klassische Virchow-Trias aus Flankenschmerz, Hämaturie und einer palpablen abdominalen Raumforderung deutet auf einen ausgedehnten Befund in fortgeschrittenem Stadium hin, macht aber im heutigen klinischen Alltag nur 15% der diagnostizierten Nierenzellkarzinome aus. Weiterhin können im Rahmen der Tumorerkrankung Allgemein- bzw. B-Symptome wie Anämie, Gewichtsverlust, Fieber, Nachtschweiß oder Verlust der normalen Leistungsfähigkeit auftreten.^{2,26}

Paraneoplastische Syndrome kommen bei 20% der Patienten bei der Erstdiagnose eines Nierenzellkarzinoms vor. Darunter fallen die Hyperkalziämie, die sowohl von ossären Metastasen als auch vom durch den Tumor produzierten parathormon-related-peptide (PTHrP) verursacht werden kann, die Hypertonie, hämatologische Symptome wie Polyzythämie und Erythrozytose, sowie weitere neurologische und dermatologische Symptome. Zudem ist das Stauffer-Syndrom zu erwähnen, welches durch die Erhöhung der Leberenzyme AST und ALT, eine verlängerte Prothrombinzeit, Fieber, Hepatosplenomegalie sowie Gewichtsverlust auffällt und nur bei Patienten mit Nierenzellkarzinom auftritt. Ursächlich sind nicht Lebermetastasen, sondern eine tumorzytokinvermittelte Hepatitis.³⁷

1.1.6 Diagnostik

Körperliche Untersuchung und Blutuntersuchungen spielen in der Diagnostik des Nierenzellkarzinoms zwar eine untergeordnete Rolle, sollten aber dennoch durchgeführt werden. Reduzierter Allgemeinzustand, eine palpable abdominale Raumforderung, zervikale Lymphadenopathie und ein generalisiertes Ödem der unteren Extremität, welches durch Tumordinfiltration ins Gefäßsystem ausgelöst werden kann, sind auffällige Befunde. Neben Serumkreatinin und GFR sollten bei Verdacht auf eine renale Raumforderung ein großes Blutbild, BSG, Alkalische Phosphatase, LDH und Serumkalzium genau wie Urindiagnostik nicht außer Acht gelassen werden. CRP und Leukozyten sind in aller Regel erhöht und können auch als Prognosefaktor bestimmt werden, wenngleich sie nicht die beste Vorhersagegenauigkeit bieten.³⁸ Spezifische Tumormarker sind bisher nicht etabliert.

Das diagnostische Hauptaugenmerk beim Verdacht auf eine renale Raumforderung liegt bei den radiologischen Untersuchungen, vor allem beim Ultraschall und der Multidetektorcomputertomographie (MDCT).³⁹ Bei den meisten Raumforderungen kann so zwischen zystischen und soliden Befunden unterschieden werden. Zystische Raumforderungen werden nach Bosniak in fünf Kategorien unterteilt, aufsteigend von benigne über semimaligne nach maligne.⁴⁰

Ein MDCT-Abdomen gibt zudem Auskunft über Tumorausdehnung, Venen- und Lymphgefäßinfiltration sowie über den Zustand der kontralateralen Niere, der Nebennieren und der Leber. Zur Untersuchung der Nierendurchblutung, aber auch zur Unterscheidung zwischen Onkozytom und Nierenzellkarzinom⁴¹, kann eine Kontrastmittel-MDCT herangezogen werden. Die Magnet-Resonanztomographie (MRT) erlaubt durch höheren Weichteilkontrast⁴² eine genauere Beurteilung des Tumors und ggf. einer Tumordinfiltration in die Vena cava, ist jedoch als Zusatzuntersuchung anzusehen, falls die MDCT nicht ausreichend Informationen liefert oder eine Untersuchung mit Kontrastmittel kontraindiziert ist.⁴³ Eine FDG-PET (¹⁸F-Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissionstomographie) ist aktuell keine Standarduntersuchung und bietet bislang keinen entscheidenden Vorteil hinsichtlich Diagnose oder Prognose.⁴⁴ Eine CT-

Untersuchung des Thorax sollte bei histologisch gesichertem Nierenzellkarzinom immer durchgeführt werden, weitere CT-Untersuchungen zur Detektion von Metastasen (z.B. Cranio-CT) sollten nur dann durchgeführt werden, wenn Symptome bzw. ein klinischer Verdacht vorliegen, die für eine Metastasierung sprechen. Ossäre Metastasen lassen sich ebenfalls mittels CT diagnostizieren²⁶, sensitiver sind jedoch Knochen-Szintigraphie und FDG-PET⁴⁵.

Welche Dignität und welcher histologische Subtyp bei einer renalen Raumforderung vorliegen, zeigt letztendlich erst die histologische Untersuchung des Nephrektomiepräparates durch den Pathologen. Sun et al. zeigten jedoch, dass es mittels Kontrastmittel-MRT möglich sein könnte, zwischen klarzelligem, papillärem und chromophobem Nierenzellkarzinom zu unterscheiden, was für eine neoadjuvante Behandlung wichtig sein könnte.⁴⁶ Präoperative Feinnadelbiopsien sind hochsensitiv und -spezifisch, allerdings wird bei bis zu 22% aller Biopsien lediglich normales Nierengewebe gewonnen. Problematisch sind nekrotische, zystische oder sehr kleine Tumoren, weshalb eine Verbesserung der Biopsietechnik wünschenswert wäre.⁴⁷ Für Patienten mit metastasierten Tumoren ist vor systemischer Therapie eine Biopsie empfohlen.⁴⁸

1.1.7 Klassifikation nach TNM

Das Staging der Nierenzellkarzinome wird nach dem von der Union internationale contre le cancer (UICC) entwickelten TNM-System vorgenommen. Der Pathologe beurteilt Tumorgöße und -ausbreitung (T), regionäre (hiläre, abdominal paraaortale und parakavale) Lymphknoten (N) und das Vorliegen von Fernmetastasen (M). Aus dieser Beurteilung werden dann vier Tumorstadien abgeleitet (siehe Tabelle 1). Zusätzlich wird im histopathologischen Grading nach Fuhrman⁴⁹ (G) angegeben, welcher Differenzierungsgrad bei den Tumorzellkernen vorliegt.

T Primärtumor

- TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- T0 Kein Anhalt für Primärtumor
- T1 Tumor maximal 7 cm in größter Ausdehnung, auf die Niere begrenzt
- T1a Tumor ≤ 4 cm in größter Ausdehnung
- T1b Tumor > 4 cm, aber ≤ 7 cm in größter Ausdehnung
- T2 Tumor > 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
- T2a Tumor > 7 cm aber ≤ 10 cm in größter Ausdehnung
- T2b Tumor > 10 cm, auf die Niere beschränkt
- T3
- T3a Ausgeprägte Tumorausdehnung in die Nierenvene(n) oder deren segmentale (muskelstarke) Äste, oder der Tumor befällt perirenales und/oder perihiläres Fett, aber nicht über die Gerota'sche Faszie hinaus
- T3b Tumorausdehnung in die Vena cava unterhalb des Zwerchfells
- T3c Tumorausdehnung in die Vena cava oberhalb des Zwerchfells oder Befall der Venenwand
- T4 Tumorausdehnung über die Gerota'sche Faszie hinaus (einschließlich zusammenhängender Ausdehnung in die ipsilaterale Nebenniere)

N Regionäre Lymphknoten

- NX Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
- N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1 Metastase(n) in einem regionären Lymphknoten
- N2 Metastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten

M Fernmetastasen

- M0 Keine Fernmetastasen
- M1 Fernmetastasen

G Histopathologisches Grading nach Fuhrman

- GX Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
- G1 Gut differenziert
- G2 Mäßig differenziert
- G3 Schlecht differenziert
- G4 Undifferenziert

| Stadiengruppierung | | | |
|---------------------------|---------|---------|----|
| I | T1 | N0 | M0 |
| II | T2 | N0 | M0 |
| III | T3 | N0 | M0 |
| | T1 – T3 | N1 | M0 |
| IV | T4 | jedes N | M0 |
| | jedes T | N2 | M0 |
| | jedes T | jedes N | M1 |

Tabelle 1: TMA-Klassifikation 2009, modifiziert nach Sobin et al.⁵⁰

1.1.8 Prognose

Eine zuverlässige Abschätzung der Prognose eines Patienten mit Nierenzellkarzinom ist vor, während und nach einer Therapie von großer Bedeutung. Den vielfältigen Eigenschaften, Ursachen und Ausbreitungen der Tumoren entsprechend existieren zahlreiche individuelle Prognosefaktoren.

Grundsätzlich ist das Ductus-Bellini-Karzinom der aggressivste Subtyp des Nierenzellkarzinoms mit der schlechtesten Prognose, bei Diagnosestellung sind bis zu zwei Drittel der Tumoren bereits metastasiert. Klarzellige Tumoren sind ebenfalls sehr aggressiv, die Prognose von papillären und chromophoben Tumoren ist hingegen deutlich besser.⁵¹ Chevillat et al.⁵² publizierten 2003 über alle Stadien folgende 5-Jahresüberlebensraten: Klarzelliges Nierenzellkarzinom 68,9%, papilläres Nierenzellkarzinom 87,4% und chromophobes Nierenzellkarzinom 86,7%.

Ein weiterer wichtiger prädiktiver Faktor ist das histopathologische Grading nach Fuhrman. Lang et al. veröffentlichten 5-Jahresüberlebensraten von 65 bis 76%, 30 bis 70%, 20 bis 50% und 10 bis 35% für Tumoren mit G1, G2, G3 und G4. Bezüglich der TNM-Stadieneinteilung lagen die 5-Jahresüberlebensraten für Stadium I bei 90 bis 100%, für Stadium II bei 75 bis 95% und für die Stadien III und IV bei 60 bis 70% und 15 bis 30%.⁵³

Sowohl der Nachweis von Tumornekrosen als auch die sarkomatoide Entdifferenzierung der Tumorzellen sprechen für ein aggressiveres Tumorwachstum mit schnellerer Metastasierung, woraus eine schlechtere Prognose resultiert. De Peralta-Venturina et al. berichten über 5-

Jahresüberlebensraten von 22% für sarkomatoide Tumoren und 79% für nicht-sarkomatoide Tumoren.⁵⁴ Bei Tumoren mit Nekrose ist die Wahrscheinlichkeit, in Folge der Erkrankung zu versterben für Patienten mit klarzelligem oder chromophobem Nierenzellkarzinom vier bis fünf Mal höher als ohne Nekrose.⁵⁵ Klinische Zeichen wie Flankenschmerz, Hämaturie, tastbarer Tumor, B-Symptome, paraneoplastische Syndrome, Thrombozytose oder Anämie sind weitere mit ungünstiger Prognose korrelierende Faktoren.

In Blut oder Urin nachweisbare Tumormarker existieren für das Nierenzellkarzinom aktuell nicht, die Datenlage für die meisten molekularen oder genetischen Marker (VHL, HIF, mTOR (mammalian Target of Rapamycin), CAIX (carbonic anhydrase IX)) ist nicht eindeutig. Lediglich für erhöhte VEGF-Expression wurde eine Assoziation zu aggressiverem Tumorwachstum nachgewiesen.^{56,57}

Basierend auf den Einflussgrößen wurden verschiedene Prognosemodelle entwickelt, deren Vorhersagegenauigkeit in der Regel bei über 80% liegt. Da histologische Merkmale den größten Einfluss auf die Prognose haben, sind die so genannten postoperativen Modelle den präoperativen deutlich überlegen und werden daher bevorzugt zur Prognoseabschätzung angewandt. Die vier gängigsten postoperativen Modelle sind die Normogramme nach Kattan⁵⁸, nach Karakiewicz⁵⁹, das UCLA (University of California, Los Angeles) Integrated Staging System (UISS)⁶⁰ und der SSIGN (stage, size, grade, necrosis)-Score⁶¹. Laufend werden weitere Normogramme entwickelt bzw. bestehende aktualisiert; in Zukunft werden auch Vorerkrankungen, Lebenswandel und andere Patienteneigenschaften in den Scores berücksichtigt werden, sodass eine noch zuverlässigere Prognoseabschätzung möglich erscheint.⁶²

| Modell | Einflussgrößen | Endpunkte | Vorhersagegenauigkeit ^{56,57} |
|-------------|---|--|--|
| Kattan | TNM Tumordurchmesser Histologischer Subtyp Symptome | Progressionsfreies Überleben nach 5 Jahren | 61 bis 82% |
| Karakiewicz | TNM Tumordurchmesser Grade nach Fuhrman Alter Geschlecht Symptome (lokal/systemisch) | Krebsspezifische Überlebensraten nach 1, 2, 5 und 10 Jahren | 86,3 bis 88,0% |
| UISS | TNM Grade nach Fuhrman ECOG-Performance Status ⁶³ | 5-Jahresüberlebensrate | 81% |
| SSIGN | TNM Grade nach Fuhrman Tumordurchmesser \leq 5cm Tumornekrose | Krebsspezifische Überlebensraten nach 1, 3, 5, 7 und 10 Jahren | 81 bis 88% |

Tabelle 2: Prognosemodelle

Für metastasierte Tumoren sind Ort und Zahl der Metastasen sowie klinische Parameter relevanter als die TNM-Klassifikation oder das Fuhrman-Grading. Dementsprechend wurden auf fortgeschrittene Tumoren zugeschnittene prädiktive Normogramme entwickelt, auch Einflüsse einer eventuell durchgeführten zielgerichteten Therapie können berücksichtigt werden. Hinsichtlich ihrer Vorhersagegenauigkeit sind die Normogramme für metastasierte Tumoren den oben genannten postoperativen Modellen deutlich unterlegen.

Die wichtigsten Normogramme sind das Modell der French Group of Immunotherapy (FGI)⁶⁴, die zwischenzeitlich immer weiter verfeinerten und für verschiedene Therapiemodalitäten angepassten Modelle nach Motzer et al.⁶⁵ sowie der für Patienten mit zielgerichteter Therapie entwickelte Heng-Score⁶⁶. Das FGI-Modell berücksichtigt die Faktoren Lebermetastasen, die Zeit zwischen Tumor- und Metastasendiagnose, multifokale Metastasen und erhöhte Werte von Neutrophilen, während die Modelle nach Motzer et al. grundsätzlich auf dem Karnofsky-Index, der Zeit seit Erstdiagnose und den Werten für Hämoglobin, LDH und Serum-Kalzium basieren⁶⁵ und für Patienten

mit Interferon- α ⁶⁷- oder Sunitinib⁶⁸-Therapie angepasst werden können. Crepel et al.⁶⁹ konnten für mit Sunitinib behandelte Patienten zeigen, dass das Modell der FGI dem Motzer-Modell in der Vorhersagegenauigkeit überlegen ist.⁷⁰

Der Heng-Score basiert wie der Motzer-Score auf Karnofsky-Index, Zeit zwischen Diagnose und Therapiebeginn, den Blutwerten für Hämoglobin und Kalzium sowie zusätzlich für neutrophile Granulozyten und Thrombozyten.

1.1.9 Therapie des Nierenzellkarzinoms⁴⁸

1.1.9.1 Chirurgische Intervention

Die chirurgische Intervention ist nach wie vor der einzige kurative Therapieansatz zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms. Systemisch-medikamentöse Maßnahmen mittels Chemo-, Immun- oder antiangiogenetischer Therapie sind als palliative Behandlungsmöglichkeiten etabliert.³⁹

Für die Wahl des Operationszugangs und die Radikalität des Eingriffs sind Größe und Ausdehnung des Primärtumors, etwaige Metastasen oder ein Tumorthrombus in der V. cava, die Konstitution des Patienten, aber auch Erfahrung und Vorlieben des Operateurs entscheidend. Die radikale bzw. die partielle (NSS, nephron sparing surgery) Nephrektomie kann offenchirurgisch mittels transperitonealem, lumbalem oder thorakoabdominalem Zugang aber auch laparoskopisch durch transperitonealen oder retroperitoneoskopischen Zugang durchgeführt werden.⁷¹

1.1.9.2 Weitere ablativ Therapieverfahren

Minimal invasive Techniken wie die Radiofrequenzablation (RFA) und die Kryoablation stehen für bestimmte Indikationen als Alternative zu den oben genannten Eingriffen zur Verfügung:

- Bei älteren Patienten mit kleinen (<3cm), asymptomatischen Tumoren
- Für Patienten mit genetischer Prädisposition zu multiplen Tumoren
- Patienten mit bilateralen Tumoren
- Patienten mit Einzelniere

Bei Patienten mit multiplen Metastasen, einer Lebenserwartung von weniger als einem Jahr oder mit Gerinnungsstörungen sind die RFA und die Kryoablation kontraindiziert.⁴⁸

1.1.9.3 Therapie bei metastasierten Tumoren

Auch für Patienten, die an einem metastasierten Nierenzellkarzinom erkrankt sind, ist die Tumornephrektomie bei nicht resektablen Metastasen sinnvoll: Flanigan et al.⁷² konnten zeigen, dass die sogenannte zytoreduktive Entfernung der tumortragenden Niere in Kombination mit Interferon- α einen signifikanten Überlebensvorteil von 5,8 Monaten im Vergleich mit einer alleinigen Interferon- α -Behandlung bringt. Der potentielle Nutzen einer Kombination aus Nephrektomie und neuen zielgerichteten Substanzen (Temsirrolimus, Sunitinib, Sorafenib, Bevacizumab, Axitinib) bzw. wie eine Kombination beider Therapieansätze aussehen könnte, wird kontrovers diskutiert, allerdings liegen bislang nur retrospektive Studienergebnisse vor.^{34,73,74} Aktuell wird diese Frage prospektiv in der CARMENA-Studie (Clinical Trial to Assess the Importance of Nephrectomy) untersucht.⁷⁵

Die Resektion von Metastasen sollte, sofern dem Patienten zumutbar und technisch durchführbar, forciert werden, jedoch nur dann, wenn eine chirurgische R0-Resektion erreicht werden kann. Alt et al. zeigten krebsspezifische 5-Jahresüberlebensraten von 73% nach kompletter Resektion pulmonaler Metastasen im Vergleich zu 19% ohne Resektion. Gemessen am Überleben nach Entfernung multipler Metastasen ist das Sterberisiko ohne Metastasektomie dreimal höher.⁷⁶ Hinsichtlich der Frage, welchen Stellenwert die Entfernung von Metastasen in der Ära der monoklonalen Antikörper und der Small Molecules (zielgerichtete Therapie) hat, ist die Datenlage aktuell nicht eindeutig und das Therapieregime stark vom jeweiligen Patienten und seinen Ressourcen abhängig.⁷⁷

Bei Knochen- und Hirnmetastasen, die weder resektabel sind, noch auf eine systemische Therapie ansprechen, kann eine Bestrahlung die Beschwerden des Patienten lindern⁷⁸, wobei der palliative Aspekt im Vordergrund steht. Die Radiotherapie stellt keinen kurativen Ansatz dar.

Die rein systemische Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms ist bei irresektablen Tumoren indiziert. Da Nierenzellkarzinome vom klarzelligem Subtyp die häufigste und prinzipiell auch aggressivste Variante darstellen, werden in Therapiestudien papilläre und chromophobe Karzinome oder Sammelrohrtumoren in der Regel nicht berücksichtigt, sodass zu den selteneren Subtypen Therapieempfehlungen nur begrenzt möglich sind. Klassische Chemotherapeutika wirken in nur 4 bis 6%⁷⁹ der Fälle und sind daher nicht in den Therapieleitlinien enthalten.

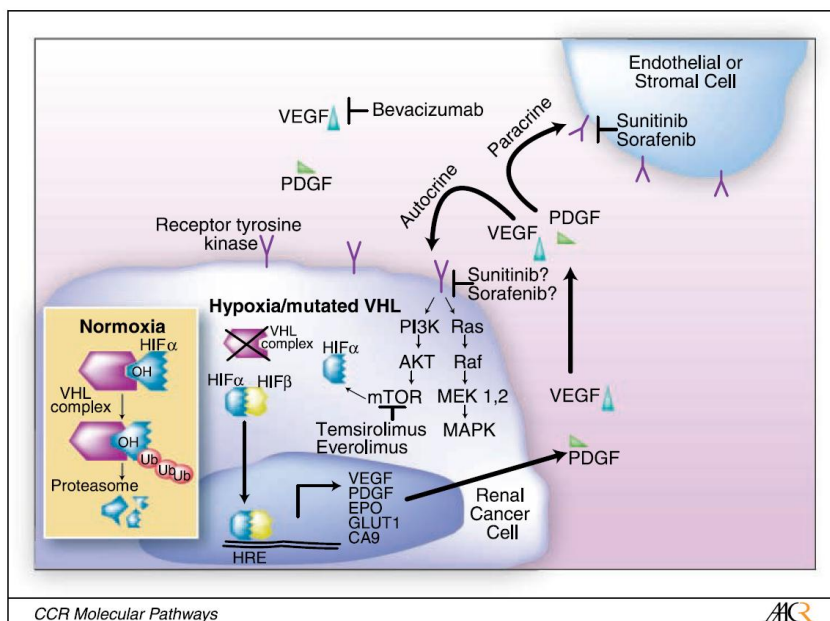
Lange Jahre waren Interferon- α und Interleukin-2 als Mono- oder Kombinations-Erstlinientherapien des metastasierten Nierenzellkarzinoms etabliert. 3 bis 31% der Patienten im metastasierten Stadium sprachen auf eine Interferon- α -Therapie an, die mittleren Überlebenszahlen reichten von 8 bis 17 Monaten, auf Interleukin-2 sprachen bei einer mittleren Überlebenszeit von maximal 17,5 Monaten 9 bis 30% an.⁸⁰

In den letzten Jahren haben neue Medikamente die Therapieempfehlungen stark verändert. Monoklonale Antikörper und Small Molecules (zielgerichtete Therapie) wirken gezielt auf Signalwege des Tumorwachstums und versprechen ein besseres Ansprechen sowie verlängerte Überlebenszahlen. Um abschätzen zu können, welche zielgerichtete Therapie individuell die wirksamste ist, etablierten Heng et al.⁶⁶ einen studienbasierten Score zur Risikostratifizierung, anhand dessen die Patienten in favourable-(low-), intermediate- und poor-(high-)risk-Gruppen eingeteilt werden können. Die Leitlinien der EAU (European Association of Urology) orientieren ihre Therapieempfehlungen am Heng-Score. Indikatoren des Scores sind der Karnofsky-Index, die zwischen Erstdiagnose und Beginn der systemischen Therapie vergangene Zeit, Werte für Hämoglobin (Hb), Serum-Kalzium, neutrophile Granulozyten und Thrombozyten. Patienten ohne Risikofaktoren werden der favourable-(low-)risk-Gruppe zugeteilt, zur intermediate-risk-Gruppe gehören Patienten mit einem oder zwei Risikofaktoren und zur poor-(high-)risk-Gruppe Patienten mit mehr als drei Risikofaktoren.

| Risikofaktoren | Grenzwert |
|--------------------------|------------------------|
| Karnofsky-Index | < 80% |
| Zeit seit Erstdiagnose | < 12 Monate |
| Hb | < unterer Referenzwert |
| Serum-Kalzium | > oberer Referenzwert |
| Neutrophile Granulozyten | > oberer Referenzwert |
| Thrombozyten | > oberer Referenzwert |

Tabelle 3 modifiziert nach Heng et al.⁸⁶

Allen zielgerichteten Therapien gemeinsam ist ihre antiangiogenetische Wirkung, sie greifen in die verschiedenen im Tumor fehlregulierten hypoxia-inducible-Signalwege ein, was in Tumornekrose oder -verkleinerung resultiert.⁸¹ Der Signalweg PI3K(Phosphoinositid-3-Kinasen)/AKT/mTOR ist die gemeinsame Endstrecke bzw. das direkte Ziel der unterschiedlichen zielgerichteten Therapien: Ziel der meisten blockierten Faktoren (PDGF (platelet derived growth factor)⁸², RAS (rat sarcoma)⁸³, c-KIT⁸⁴, FLT-3 (FMS-like tyrosine kinase 3, auch CD135⁸⁵)⁸⁶) ist PI3K, welches AKT und mTOR aktiviert. VEGF aktiviert eine mTOR-Untereinheit und führt zu erhöhter PDGF-Expression. Über aktiviertes mTOR kann die Expression der unterschiedlichen hypoxia-inducible Faktoren gesteuert werden. Da bei mutiertem VHL-Gen ein wichtiger Regulator der HIF-Expression ausfällt und gleichzeitig verstärkt VEGF vorliegt, kommt es zu einer Stimulation der HIF-Expression und damit der Angiogenese. Somit liegt der Schlüssel zur Unterdrückung der HIF-Produktion bzw. der Angiogenese in einer Inhibition von mTOR oder den verschiedenen Faktoren, die den Signalweg über PI3K aktivieren.^{87,88}



Grafik1: VHL-assoziierte Signalkaskaden nach Patel et al.⁸⁹

Der monoklonale Antikörper Bevacizumab richtet sich gegen VEGF und blockiert so die Angiogenese. In Kombination mit Interferon- α ist er zur Erstlinientherapie bei Patienten mit low- oder intermediate-risk zugelassen, für high-risk-Patienten ließ sich keine verbesserte Prognose nachweisen.⁹⁰ Nach Escudier et al. lag das progressionsfreie Überleben für die Kombinationstherapie bei 10,2 Monaten und die objektive Ansprechrates bei 31%, während für die Interferon- α -Monotherapie 5,4 Monate und ein Ansprechen bei 13% der Patienten erreicht wurde. Für eine Bevacizumab-Monotherapie gelten 8,5 Monate progressionsfreies Überleben und ein Ansprechen bei 13% der Patienten.⁹¹

Sunitinib ist ein Multi-Tyrosin-Kinase-Inhibitor (TKI) und blockiert VEGFR2, PDGFR (platelet-derived growth factor receptor), FLT-3 und c-KIT. 11 Monate progressionsfreies Überleben, 37% Therapie-Ansprechen und eine mittlere Gesamtüberlebenszeit von 26,4 Monaten werden für Sunitinib angegeben.^{92,93}

Sunitinib ist als Erstlinientherapie bei Patienten mit low- und intermediate-risk zugelassen.

Pazopanib ist als Erstlinientherapie bei Patienten mit low- oder intermediate-risk zugelassen, außerdem als Zweitlinientherapie nach vorausgegangener Behandlung mit Interferon- α oder Interleukin-2. Pazopanib inhibiert am

VEGFR1, 2 und 3 sowie am PDGFR und an c-KIT. Als Erstlinientherapie wurde ein progressionsfreies Überleben von 11,1 Monaten und als Zweitlinientherapie von 7,4 Monaten beobachtet, die Ansprechrate lag bei 30%.⁹⁴

Auch Sorafenib ist als Zweitlinientherapie nach vorausgegangener Zytokintherapie zugelassen und blockiert mehrere von Tyrosin-Kinasen abhängige Rezeptoren (VEGFR2 und 3, FLT-3, c-KIT, PDGFR) sowie die Serin-Threonin-Kinasen B-RAF und C-RAF (rapidly growing fibrosarcoma), die über das G-Protein RAS mit VEGF und PDGFR in Verbindung stehen sollen.⁹⁵

Gegenüber Placebo verdoppelt sich mit Sorafenib das progressionsfreie Überleben (2,8 vs. 5,9 Monate), nach drei Monaten Behandlung lagen die Ansprechraten bei 34 vs. 57%.⁹⁶

Eine Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor Temsirolimus ist nach den aktuellen Leitlinien als Erstlinientherapie bei high-risk-Patienten indiziert. Die Serin-Threonin-Kinase mTOR reguliert Zellwachstum und -proliferation sowie die Expression von HIF und dessen Regulatorgenen.⁹⁷ Verglichen mit Interferon- α (3,1 Monate) liegt das progressionsfreie Überleben unter Behandlung mit Temsirolimus bei 5,5 Monaten, die Ansprechraten bei 4,8 bzw. 8,6% und die mittleren Gesamtüberlebenszeiten bei 7,3 bzw. 10,9 Monaten.⁹⁸

Eine Zweitlinientherapie-Möglichkeit nach fehlgeschlagener zielgerichteter Therapie stellt Everolimus dar, ein oral applizierter mTOR-Inhibitor. Verglichen mit Placebo (1,9 Monate) wurde nach Motzer et al.⁹⁹ durch Everolimus ein progressionsfreies Überleben von 4,9 Monaten erreicht, die mittlere Gesamtüberlebenszeit ließ sich mit Everolimus um 4,8 auf 14,8 Monate steigern.

Wie die idealen Therapiesequenzen aus alternierend oder nacheinander eingesetzten oben genannten Medikamenten aussehen, wird derzeit in klinischen Studien untersucht, ebenso die Frage nach einem (neo-)adjuvanten Einsatz der zielgerichteten Therapien.¹⁰⁰

Zusammengefasst haben die beschriebenen TKI zwar eine Verbesserung der Gesamtüberlebenszeit gebracht, da es sich aber nur um Zeiträume von einigen Monaten handelt und keine Langzeit-Response bzw. keine Vollremission erreicht werden konnte, kann von einem Durchbruch in der Therapie von

Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom keine Rede sein. Obwohl TKI gegen zahlreiche Effektoren des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs wirken, ist der Effekt begrenzt, sodass der Focus bezüglich der zielgerichteten Therapie beim Nierenzellkarzinom auch auf alternative und bislang weniger genau untersuchte Signalwege wie den in dieser Arbeit untersuchten Wnt-/ β -Catenin-Signalweg gerichtet werden sollte.

1.2 β -Catenin und der Wnt-Signalweg

1.2.1 β -Catenin

β -Catenin ist ein 781 Aminosäuren langes Protein, das vom CTNNB1-Gen auf Chromosom 3p21 codiert wird und multiple sogenannte „armadillo repeat domains“ für Bindungen zwischen zwei Proteinen aufweist.¹⁰¹ Die Verbindung zweier Zellen durch adherens junctions ist eine der Hauptfunktionen von β -Catenin: In Verbindung mit α -Catenin gewährleistet es an die zytoplasmatische E-Cadherin-Domäne geknüpft die Interaktion mit Aktin und somit mit dem Zytoskelett.¹⁰² Intaktes β -Catenin sorgt also für stabile Adhäsion unter Nachbarzellen, was für Funktion, Stabilität und gerichtetes Wachstum entscheidend ist. Anders bei einem z. B. an der Zellmembran lokalisierten Defekt von β -Catenin: Durch die sogenannte epitheliale-mesenchymale Transition (EMT), bei der sich aufgrund einer Veränderung der Zell-Zell-Interaktion immobile Epithelzellen zu beweglichen fibroblastoiden Mesenchymzellen entwickeln, wird ungerichtetes bzw. unkontrolliertes Zellwachstum begünstigt, wie es bei der Kanzerogenese und dem weiteren Tumorwachstum bzw. der Metastasierung der Fall ist. Zudem bewirkt die EMT, dass E-Cadherin durch N-Cadherin ersetzt wird und vermehrt β -Catenin im Zytoplasma vorliegt, was wiederum die Expression einiger mit Angiogenese und Tumorwachstum verbundener Faktoren steigern kann (s.u.).¹⁰³

Seine zweite Hauptfunktion erfüllt β -Catenin als Effektorprotein im Wnt-Signalweg, wobei davon ausgegangen wird, dass beide β -Catenin-Hauptfunktionen vom selben Pool an β -Catenin-Molekülen abhängen und somit

eine enge Interaktion zwischen der Cadherin-abhängigen Zelladhäsion und dem Wnt-Signalweg besteht.¹⁰⁴

1.2.2 Der Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg vermittelt extrazelluläre Signale über mehrere Effektorproteine an den Zellkern und steuert so die Expression verschiedener Gene. Wnt spielt in der embryonalen und adulten Zell-Zell-Kommunikation, bei einigen hereditären Erkrankungen sowie bei der Entwicklung von Karzinomen eine entscheidende Rolle. Wnt ist ein Akronym aus den Gennamen Wingless, bekannt seit 1973, und Int1 (1982), die unabhängig voneinander mit unterschiedlichen Funktionen entdeckt wurden. 1987 identifizierten Rijsewijk et al.¹⁰⁵ die beiden Gene in *Drosophila melanogaster* als ein und dasselbe Gen.

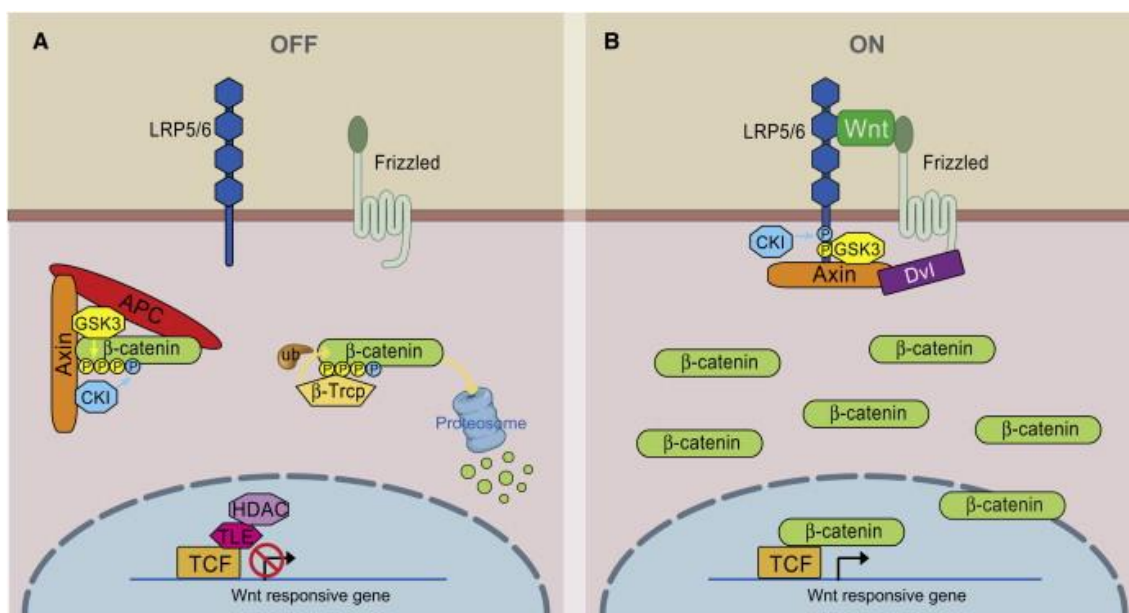
Bislang wurden 19 strukturverwandte humane Wnt-Gene identifiziert, die auf verschiedenen Chromosomen liegen und eine Strukturhomologie von minimal 18% aufweisen. Die Wnt-Proteine sind ca. 40 kDa schwer und bestehen in der Regel aus 350 bis 400 Aminosäuren, auffällig sind ein Muster von jeweils 23 oder 24 Cysteinresten und an einige Aminosäuren angehängte Fettsäuren¹⁰⁶, die für die Wnt-Sekretion aus dem endoplasmatischen Retikulum und die Signalaktivität der Wnt-Proteine von Bedeutung sind.¹⁰⁷

Für die Wnt-Proteine sind drei Hauptsignalwege bekannt, zwei nicht-kanonische und der kanonische. Die beiden nicht-kanonischen Signalwege, sprich der planar-cell-polarity (PCP)- und der kalziumabhängige-Wnt-Signalweg funktionieren ohne β -Catenin und regulieren v. a. in der Embryonalphase Polarität, gerichtetes Wachstum und Kalziumhaushalt der Zelle. Für die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege sind keine eindeutigen Verknüpfungen zu Krebserkrankungen beschrieben.¹⁰⁸

Der kanonische, β -Catenin-abhängige Wnt-Signalweg hingegen ist wesentlich mit der Regulation des adulten Zellzyklus sowie des Protoonkogens c-myc und damit mit der Kanzerogenese assoziiert. Ohne Interaktion von Wnt mit Rezeptoren an der Zellmembran sorgt der cytoplasmic destruction complex aus β -Catenin, Axin, GSK3 (Glykogen-Synthase-Kinase 3), CK1 γ (Casein-Kinase 1 γ) und APC (adenomatous polyposis coli) dafür, dass im Zytosol kein freies β -

Catenin akkumulieren kann. Nach Phosphorylierung durch GSK3 und CK1 γ und einer anschließenden Ubiquitinylierung mittels β -Transducin repeat-containing protein (β TrCP) wird β -Catenin im Proteasom abgebaut.¹⁰⁹

β -Catenin kann im Zytosol akkumulieren, wenn freies, extrazelluläres Wnt an die Transmembranproteine Frizzled (Fz) und Lrp5/6 (low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6) bindet. Der Ligand-Rezeptor-Komplex veranlasst GSK3 und CK1 γ zur Phosphorylierung des zytoplasmatischen Lrp5/6-Endes, anschließend bindet Axin vermittelt durch Dishevelled (Dsh)¹¹⁰ an phosphoryliertes Lrp5/6. Ohne Axin zerfällt der cytoplasmic destruction complex, sodass β -Catenin nicht mehr phosphoryliert, ubiquitinyliert und im Proteasom abgebaut wird. Akkumuliertes β -Catenin wandert in den Zellkern und bindet nach Verdrängung der Transkriptions-Repressoren Groucho/TLF (transducin-like enhancer of split)¹¹¹ an die DNA-Bindeproteine TCF und Lef, woraus eine Hochregulierung der Wnt-Zielgene c-myc, Cyclin D1, VEGF etc. resultiert.¹¹²⁻¹¹⁴



Grafik 2: Der Wnt-Signalweg nach MacDonald et al. 2009¹¹⁵

Ergänzend zur oben geschilderten Rolle von β -Catenin im Wnt-Signalweg existieren Studienergebnisse, wonach β -Catenin auch durch die zytoplasmatischen Proteinkinasen A (PKA) und D1 (PKD1) phosphoryliert wird,

allerdings nicht an denselben Aminosäure-Termini, die GSK3 und CK1 γ zur Phosphorylierung verwenden. β -Catenin mit alternativer Phosphorylierung wird nicht ubiquitinyliert und abgebaut, sondern fördert im Zellkern die Transkriptionsaktivität von TCF/Lef bzw. aktiviert den Transkriptions-Coaktivator CREB-Binding Protein und führt somit trotz Phosphorylierung zu erhöhter Expression der oben genannten Wnt-Zielgene.^{116,117} Nach Maher et al.¹¹⁸ legt das jeweilige alternative β -Catenin-Phosphorylierungs-Muster fest, ob β -Catenin seine Funktionen primär zytoplasmatisch oder im Nukleus ausübt.

1.2.3 Zusammenhänge zwischen Wnt-Signalweg und Nierenzellkarzinom

Auch beim Nierenzellkarzinom spielt der Wnt-Signalweg eine große Rolle hinsichtlich Krankheitsentwicklung, Tumorwachstum und Metastasierung. Für die meisten Wnt-abhängigen Rezeptoren, Kinasen und sonstigen Proteine sind Fehlregulationen oder Interaktionen mit anderen Signalwegen, die mit der Entstehung von Nierenzellkarzinomen verknüpft sind, bekannt.

Janssens et al.¹¹⁹ konnten bei klarzelligem Nierenzellkarzinomen eine im Vergleich zu Normalgewebe erhöhte Expression der Wnt-Rezeptoren Fz5 und Fz8 nachweisen, für Fz5 gelang auch der Nachweis einer assoziierten Akkumulation von nukleärem Cyclin D1. Für Fz10 wurde der Ligand hypoxia-inducible protein-2 (HIG2) identifiziert, der sowohl durch die Bindung an Fz10 als auch durch direkte Interaktion mit dem β -Catenin-TCF-Komplex im Nukleus Zellproliferation induziert.¹²⁰ Im Maus-Modell konnten Sansom et al.¹²¹ durch Manipulation am APC-Gen die Entstehung von Nierentumoren induzieren. Auch zum mTOR-Signalweg besteht im Wnt-Signalweg eine Verknüpfung: Nach Inoki et al. blockiert Wnt unanhängig von β -Catenin die GSK3 und aktiviert so mTOR.¹²²

Bei 50% der sporadischen klarzelligem Nierenzellkarzinome liegt eine VHL-Mutation vor (s. o.). Peruzzi et al.¹²³ und Chitalia et al.¹²⁴ konnten feststellen, dass β -Catenin über VHL-abhängige E3-Ubiquitin-Ligasen abgebaut wird. Durch die VHL-Mutation entfällt dieser Mechanismus, β -Catenin kann schneller akkumulieren und seinen Einfluss auf den Zellzyklus ausüben. Zudem interagieren die VHL-Zielmoleküle HIF-1 α und HIF-2 α mit β -Catenin: Während

HIF-1 α den nukleären Komplex aus β -Catenin und TCF spaltet, verstärkt HIF-2 α durch Bindung an den β -Catenin-TCF-Komplex dessen Transkriptionsaktivität.¹²⁵

Weitere Auffälligkeiten wurden in den Genen CXXC4 und IGFBP4 aufgezeigt. CXXC4 codiert für den Wnt-Inhibitor Idax und ist beim Nierenzellkarzinom homozygot deletiert.¹²⁶ IGFBP4 codiert für Insulin-like growth factor-binding protein 4; Ueno et al.¹²⁷ beschrieben für das metastasierte Nierenzellkarzinom eine Überexpression mit konsekutiver Wnt-Aktivierung.

Reguläre Antagonisten des Wnt-Signalweges sind sFRPs (secreted Frizzled-related proteins) und WIF-1 (Wnt-inhibitory factor 1) durch Bindung freier Wnt-Moleküle sowie die Familie der Dickkopf-Proteine (DKK), die den Wnt-Signalweg durch Bindung an Lrp5/6 hemmen. Der Einfluss der Antagonisten auf Wnt unterliegt epigenetischer Steuerung, zum Teil liegen widersprüchliche Daten bzw. Funktionsbeschreibungen der Antagonisten vor. Werden sFRP5, WIF-1 oder DKK1-3 hochreguliert, können sie im Nierenzellkarzinom Apoptose induzieren. Werden einige der Antagonistengene durch Hypermethylierung epigenetisch gebremst, resultiert dies in Wnt-Aktivierung und gegebenenfalls Tumorprogress, nach Urakami et al.¹²⁸ besteht eine signifikante Relation des Methylierungsgrades zum Tumorstadium. Für hochregulierte DKK4- und sFRP1-3-Gene wurde ein Tumorprogress beobachtet.¹²⁹

Für immunhistochemische (IHC) Färbungen von Präparaten klarzelliger Nierenzellkarzinome mit Wnt-Antikörpern liegt eine Studie von Hsu et al.¹³⁰ vor, für β -Catenin-Antikörper wurden einige wenige Studien durchgeführt. Hsu et al. konnten zeigen, dass die Expression von Wnt10a im Nierenzellkarzinomgewebe im Vergleich zu Normalgewebe stark erhöht ist und dies sowohl mit der Entwicklung eines Nierenzellkarzinoms, als auch mit schlechteren Langzeitergebnissen in Zusammenhang steht (s.u.). In derselben Untersuchung wiesen die Autoren für β -Catenin im Karzinomgewebe erhöhte Expressionen zytoplasmatisch und nukleär, sowie eine niedrigere β -Catenin-Expression membranös nach.

Die weiteren bislang für β -Catenin publizierten Daten stehen zum Teil im Widerspruch zueinander und sind aufgrund unterschiedlicher Methoden und Endpunkte schwer miteinander zu vergleichen:

| Studie | ccRCCs | Färbung | | | Korrelationen |
|---|--------|-----------|-----------------|---------|---|
| | | membranös | zytoplasmatisch | nukleär | |
| Kim et al. ¹³¹ 2000 | 22 | 77,3% | 22,7% | 0% | k. A. |
| Bilim et al. ¹³² 2000 | k. A. | k. A. | k. A. | k. A. | Abgeschwächte membranöse Färbung korreliert mit nodaler Infiltration und fortgeschrittenem Tumorstadium |
| Aaltomaa et al. ¹³³ 2004 | 101 | 100% | 100% | 14% | Abgeschwächte membranöse Färbung korreliert mit venöser und perineuraler Infiltration sowie kurzem RFS (recurrence free survival) |
| Bruder et al. ¹³⁴ 2007 | 3 | 100% | 66% | 33% | k. A. |
| Ronkainen et al. ¹³⁵ 2010 | 128 | k. A. | 9% | 44% | Nukleäre Färbung korreliert mit niedrigem Fuhrman-Grade |
| Lian et al. ¹³⁶ 2012 | 48 | k. A. | 91,7% | k. A. | Zytoplasmatische Färbung korreliert mit höherem Fuhrman-Grade, Tumorstadium und kürzerem Langzeitüberleben |
| Hsu et al. ¹³⁰ 2012 | 284 | 100% | 100% | 100% | Nukleäre Färbung korreliert mit Karzinogenese und schlechterer Prognose bzw. vermehrten RCC-abhängigen Todesfällen |

Tabelle 4: IHC-Studien β -Catenin

1.3 Ziel der Studien

Der Wnt-Signalweg spielt bei Entstehung und Wachstum des Nierenzellkarzinoms eine kontrovers diskutierte Rolle. Bislang vorliegende Studien analysieren einzelne Faktoren bzw. Rezeptoren des Wnt-Signalwegs mit relativ kleinen Kollektiven, gehen aber nicht auf spezifische immunhistochemische Färbemuster für Wnt-Antikörper ein. Die wenigen Studien zur immunhistochemisch gemessenen β -Catenin-Expression in klarzelligen Nierenzellkarzinomen kommen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen an relativ kleinen Kollektiven und liefern mangels Wnt-Färbung keine explizite Auskunft über die Interaktion der beiden Proteine.

Die vorliegende Untersuchung soll anhand von 278 Tumorproben Auskunft über den Bezug klinischer Parameter, insbesondere bezüglich der onkologischen Fragestellungen nach krebsspezifischer (Cancer-Specific-Survival, CSS) und gesamter Überlebenszeit (Overall Survival, OS), zur immunhistochemischen Wnt- bzw. β -Catenin-Expression geben. Mögliche Korrelationen können für die Entwicklung zukünftiger diagnostischer und therapeutischer Optionen ausschlaggebend sein.

Folgende konkrete Fragestellungen sollen durch die vorliegende Arbeit beantwortet werden:

1. Zu welchen der erhobenen klinischen Daten lassen sich signifikante Verknüpfungen zur Färbecharakteristik eines der untersuchten Antikörper nachweisen?
2. Inwieweit korreliert die Lokalisation (membranös, zytoplasmatisch, nukleär) der Wnt- und β -Catenin-Färbungen mit den vorliegenden klinischen Daten?
3. Lassen sich anhand bestimmter Färbemuster Aussagen über Prognose oder Langzeitüberlebensdaten treffen?
4. Wie unterscheiden sich die Färbemuster in den einzelnen Tumorstadien und lassen sich Aussagen treffen, auf welche Krankheitsphase Wnt und β -Catenin besonderen Einfluss haben?
5. Liefern die Untersuchungen neue Aspekte für die Entwicklung zielgerichteter Wnt- bzw. β -Catenin-Antagonisten?
6. Inwiefern bestätigen bzw. widerlegen die Ergebnisse die bisher bekannten Einflüsse der Wnt-/ β -Catenin-Kaskade auf die Entstehung und das Wachstum von klarzelligen Nierenzellkarzinomen?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenkollektiv und Datenerhebung

Zunächst wurden die Patientendaten für alle zwischen Mai 1993 und März 2011 an der Klinik für Urologie der Universität Tübingen durchgeführten radikalen oder partiellen Nephrektomien gesammelt. Für alle Patienten wurden die Befunde der histologischen Untersuchung des Nephrektomiepräparates recherchiert und neben Patienten- und Archivdaten folgende Parameter soweit im Befund enthalten in einer Tabelle festgehalten:

- OP-Datum
- Tumorausdehnung (T)
 - Tumordurchmesser
 - Peripelvine Infiltration durch den Tumor
 - Infiltration der Capsula fibrosa renis durch den Tumor
 - Infiltration des perirenal Fettgewebes durch den Tumor
 - Infiltration des Nierenbeckens durch den Tumor
 - Infiltration der Nebenniere durch den Tumor
- Regionäre Lymphknotenmetastasen (N)
- Fernmetastasen (M)
 - Lokalisation der Fernmetastasen
 - Datum des ersten Auftretens von Fernmetastasen
- Ausmaß der Resektion (R)
 - Minimaler Resektionsrand
- Tumorinvasion in Venen (V)
 - Lokalisation der venösen Infiltration
- Tumorinvasion in Lymphgefäße (L)
- Histopathologisches Grading nach Fuhrman (G)
- Histologische Diagnose
 - Klarzelliges Nierenzellkarzinom

- Papilläres Nierenzellkarzinom
 - Typ 1
 - Typ 2
- Chromophobes Nierenzellkarzinom
- Sammelrohr-/Ductus-Bellini-Karzinom
- Urothel-Karzinom
- Onkozytom
- Angiomyolipom
- Zystenniere
- Hydronephrose
- Schrumpfnieren
- Lokalisation des Tumors
 - Multilokuläres Tumorwachstum
 - Lokalisation des Tumors linke/rechte Niere
 - Lokalisation des Tumors im Unter-/Mittel-/Oberpol
- Morphologie der Tumorzellen
 - Tumornekrose
 - Sarkomatoide Entdifferenzierung von Tumorzellen
- Datum des Auftretens eines Tumorrezidivs
- Follow-up
 - Letztes Follow-up
 - Sterbedatum
 - Tod abhängig vom Nierentumor
- Zweittumor
 - Datum des ersten Auftretens eines Zweittumors
 - Lokalisation des Zweittumors
- Operation
 - Art und Technik des Eingriffs
 - Dauer
 - Komplikationen

Unter den Patienten fanden sich 606 mit klarzelligem Nierenzellkarzinom. Die TNM-Klassifikation wurde bei allen Tumoren soweit nötig an die aktuelle Version (2009) der UICC⁵⁰ angepasst.

Material und Methoden

Nach Überprüfung des vorgeschlagenen Studiendesigns stimmte die Ethikkommission der Universität Tübingen den geplanten Untersuchungen zu (396/2012BO1).

Für das Kollektiv dieser Studie wurden aus den Fällen mit klarzelligem Nierenzellkarzinom diejenigen ausgewählt, die zwischen Mai 1993 und Dezember 2006 operiert wurden und eine Tumorausdehnung von entweder T1(a,b) oder T3(a,b,c) aufwiesen. Bei T1-Tumoren wurden G3-Tumoren ausgeschlossen, bei T3-Tumoren die G1-Tumoren, sodass eine Gegenüberstellung von Tumoren im Anfangsstadium und im fortgeschrittenen Stadium vorgenommen werden kann. Es ergab sich ein Kollektiv von 286 Patienten, für acht davon war im Archiv des Instituts für Pathologie der Universität Tübingen keine Gewebeprobe auffindbar. Die verbleibenden 278 Gewebeproben setzen sich zusammen aus 111 T1a-, 58 T1b-, 98 T3a-, acht T3b- und drei T3c-Tumoren. Für 213 Tumoren konnte auch Normalgewebe isoliert werden.

Im Durchschnitt lag das Alter aller Patienten bei Nephrektomie bei $62,2 \pm 12,5$ (Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (standard deviation, SD)) Jahren, der Tumordurchmesser bei $5,26 \pm 2,91$ (MW \pm SD) Zentimetern.

| | | T1a | T1b | T3a | T3b | T3c |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Anzahl Präparate | Pat. | 111 | 58 | 98 | 8 | 3 |
| | % | 39,9% | 20,8% | 35,3% | 2,9% | 1,1% |
| Geschlecht | m/w | 76/35 | 39/19 | 72/26 | 7/1 | 1/2 |
| Durchschnittsalter | Jahre | 61,55 | 60,53 | 65,40 | 62,51 | 58,35 |
| Durchschnittliche Tumogröße | cm | 2,92 | 5,52 | 7,15 | 10,49 | 9,5 |
| N1/2 | Pat. | 0 | 0 | 10 | 3 | 0 |
| | % | 0% | 0% | 10,2% | 37,5% | 0% |
| M1 | Pat. | 3 | 7 | 27 | 1 | 1 |
| | % | 2,7% | 12% | 27,5% | 12,5% | 33,3% |
| G1 | Pat. | 33 | 13 | 0 | 0 | 0 |
| | % | 29,7% | 22,4% | 0% | 0% | 0% |

Material und Methoden

| | | | | | | |
|-----------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| G2 | Pat. | 78 | 45 | 57 | 7 | 1 |
| | % | 70,2% | 77,5% | 58,1% | 87,5% | 33,3% |
| G3/4 | Pat. | 0 | 0 | 41 | 1 | 2 |
| | % | 0% | 0% | 41,8% | 12,5% | 66,6% |
| Tumornekrose | Pat. | 27 | 24 | 56 | 5 | 2 |
| | % | 24,3% | 41,3% | 57,1% | 62,5% | 66,6% |
| Sarkomatoide Tumorzellen | Pat. | 0 | 0 | 19 | 0 | 0 |
| | % | 0% | 0% | 19,3% | 0% | 0% |

Tabelle 5: Kollektiv

2.1.2 Untersuchungsmaterial

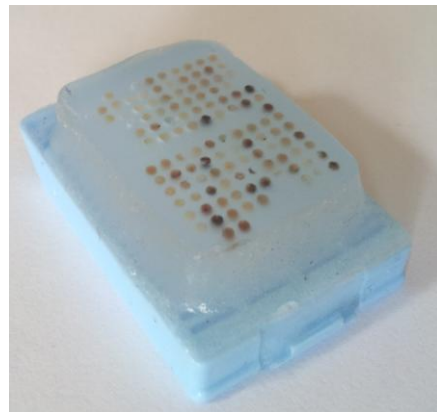
Aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Universität Tübingen wurden für alle 278 Fälle in Paraffin fixierte Blöcke der Nephrektomiepräparate und die entsprechenden Hämatoxylin-Eosin(HE)-gefärbten Schnitte herausgesucht. Gemäß den Angaben im Histologiebefund wurden sowohl Präparate mit Tumor- als auch mit Normalgewebe entnommen und nach T- und G-Stadium sortiert. An den Schnitten wurden nach mikroskopischer Begutachtung geeignete Areale von Tumor- und Normalgewebe durch Dr. med. Marcus Scharpf markiert.

2.2 Methoden

2.2.1 Der Tissue Micro Array (TMA)

Die Technik des Tissue Micro Arrays wurde erstmals 1998¹³⁷ beschrieben und ist heute eine etablierte Methode zur standardisierten, zeit- und geldsparenden Untersuchung einer Vielzahl von Gewebeproben unterschiedlicher Organe und Dignitäten. Bis zu 1000 nur Mikro- oder Millimeter durchmessende Gewebeproben werden in einen ca. zwei auf drei Zentimeter messenden Paraffinblock (Recipient) gestanzt, fixiert, mittels Mikrotom geschnitten und schließlich auf einem handelsüblichen Objektträger gefärbt. Immunhistochemische Färbungen können so für eine Vielzahl von

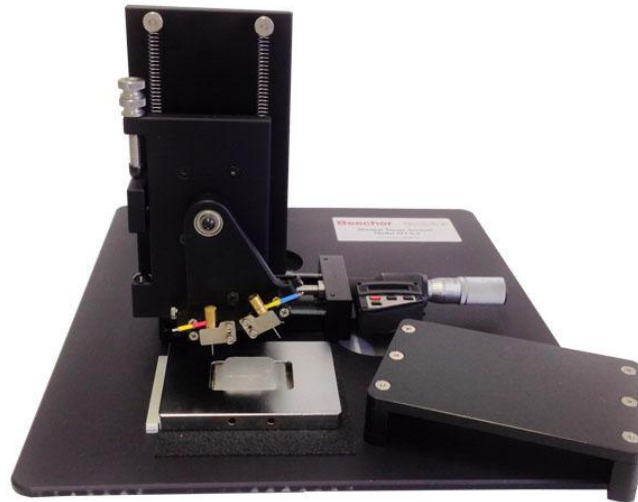
Gewebeproben simultan durchgeführt werden, ohne dass labortechnische Details (z.B. Inkubationszeiten, Temperaturschwankungen) für den Vergleich der Proben untereinander eine allzu große Rolle spielen. So erlaubt diese Hochdurchsatzmethode statistisch valide Aussagen zur Expression verschiedener Proteine und wird in Forschung und Diagnostik häufig eingesetzt.¹³⁸



Grafik 3: Tissue Micro Array des Kollektives

2.2.1.1 Erstellen der Tissue Micro Arrays

Mit dem Tissue Arrayer MTA-1 von Beecher Instruments (Sun Prairie, Wisconsin, USA) wurden aus den Tumor- und Normalgewebeproben der 278 Studienpatienten insgesamt acht Arrays erstellt. Der Arrayer ist mit zwei Hohladeln ausgestattet, die eine zum Ausstanzen eines Gewebezyinders aus den Nephrektomie-Paraffinblöcken (Donor), die andere zum Ausstanzen eines passenden Hohlraumes im am Arrayer arretierten Recipient-Block. Zunächst wird der Hohlraum in den Recipient-Block gestanzt und der entnommene Paraffinzyylinder verworfen. Anschließend wird auf die Donor-Hohladel gewechselt, die im Arrayer auf den Recipient-Hohlraum ausgerichtet ist. Ein mit dem markierten HE-Schnitt abgeglichenen Donorblock wird auf eine Brücke über den Recipient-Block gelegt, das markierte Areal wird ausgestanzt und dann nach Entfernung der Brücke direkt in den Hohlraum des Recipient-Blockes eingebracht.



Grafik 4: Tissue Arrayer MTA-1¹³⁹

Auf diese Weise wurden pro Reihe im Abstand von 0,75 Millimetern sechs jeweils einen Millimeter durchmessende T1a- oder -b-Gewebestücken in die linke Hälfte des Recipient-Blocks gesetzt. Pro Sechserreihe sind zwei Fälle mit jeweils zwei Tumorproben (Tu) und einer Probe korrespondierendes Normalgewebes (N) abgebildet. In die rechte Hälfte wurden in gleicher Weise Sechserreihen von T3a-, -b- oder -c-Gewebestücken eingebracht. Zur Orientierung wurde in der Mitte des Recipient-Blocks ein zwei Millimeter breites Areal freigelassen und nach einem festgelegten Muster Stanzzylinder von Plazenta-Gewebe am Rand des Blocks hinzugefügt. Alles wurde in einem Schema (s. u., Tabelle 8) festgehalten, hier wurden auch die den einzelnen Fällen zugeordneten Nummern der Donor-Blöcke eingetragen. Je nach Größe des Recipient-Blocks entstanden so pro Block zweimal neun oder zweimal zehn Sechserreihen von Tumor- oder Normalgewebe im Abstand von je 0,75 Millimetern.

Material und Methoden

| | | Tu | Tu | N | Tu | Tu | N | | Tu | Tu | N | Tu | Tu | N |
|------|----------|----|----|----|----|----|----|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| I | | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | | 187 | 187 | 187 | 188 | 188 | 188 |
| II | Placenta | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 | | 171 | 171 | 171 | 172 | 172 | 172 |
| III | Placenta | 5 | 5 | 5 | 6 | 6 | 6 | | 173 | 173 | 173 | 174 | 174 | 174 |
| IV | | 7 | 7 | 7 | 8 | 8 | 8 | | 175 | 175 | 175 | 176 | 176 | 176 |
| V | | 9 | 9 | 9 | 10 | 10 | 10 | | 177 | 177 | 177 | 178 | 178 | 178 |
| VI | | 11 | 11 | 11 | 12 | 12 | 12 | | 179 | 179 | 179 | 180 | 180 | 180 |
| VII | | 13 | 13 | 13 | 14 | 14 | 14 | | 181 | 181 | 181 | 182 | 182 | 182 |
| VIII | | 15 | 15 | 15 | 16 | 16 | 16 | | 183 | 183 | 183 | 184 | 184 | 184 |
| IX | | 17 | 17 | 17 | 18 | 18 | 18 | Placenta | 185 | 185 | 185 | 186 | 186 | 186 |

Tabelle 6: TMA-Schema

Die fertigen TMAs wurden abschließend noch soweit erhitzt, dass die Probenzylinder fest ins Paraffin einschmolzen und für den anschließenden Schnitvorgang mittels Mikrotom stabilisiert wurden. Die Schnitte von drei Mikrometern wurden bei 48°C im Wasserbad geglättet und nach Aufziehen auf einen Objektträger (Superfrost-Plus, Langenbrinck, Teningen) auf einer Wärmeplatte getrocknet.

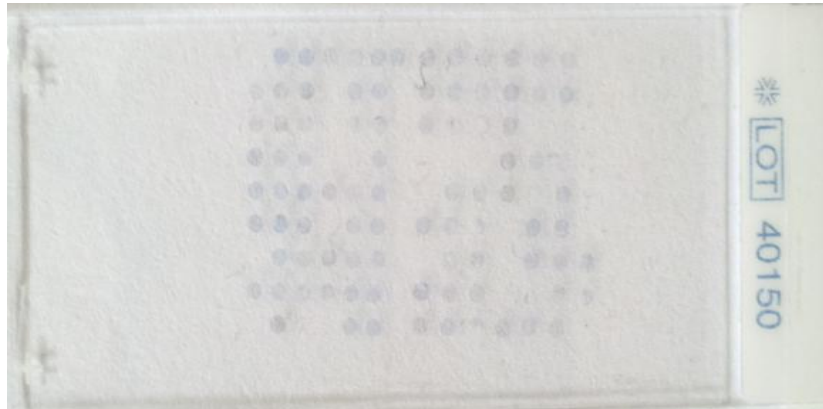


Grafik 5: Die acht Tissue Micro Arrays mit den Proben der 278 Patienten

2.2.2 Immunhistochemie (IHC)

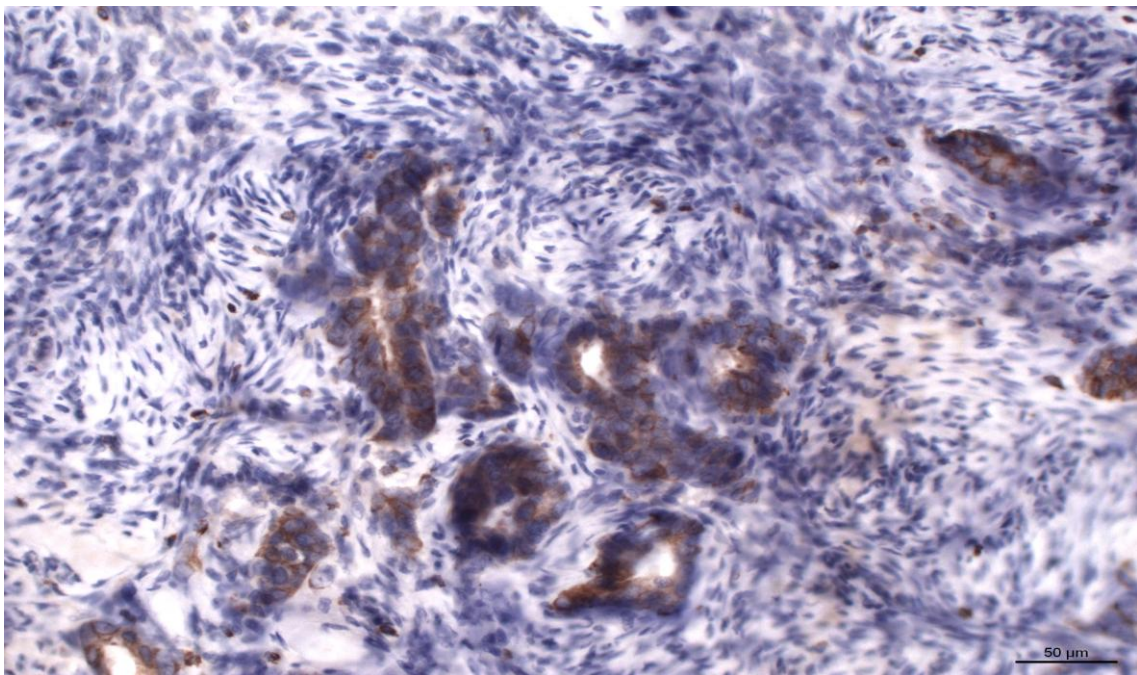
Zunächst wurden die Präparate bei Raumtemperatur in Xylen entparaffiniert, danach erfolgte die Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe durch wiederholtes Einlegen der Schnitte in Ethanol (Ethanol-Konzentrationen 100%, 96% und 70%). Dann wurden die auf Objektträgern fixierten Schnitte im Färbeautomaten Benchmark XT (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA) mit der auf TBE-Puffer (TRIS, Borat, EDTA) basierenden Standardlösung CC1 (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA) zur Antigendemaskierung behandelt. Anschließend erfolgte die Applikation der Wnt1- und β -Catenin-Antikörper: Der Wnt-Antikörper (Cat. No. AB15251, Abcam, Cambridge, Massachusetts, USA) wurde in einer im Verhältnis 1:100 verdünnten Lösung appliziert, der β -Catenin-Antikörper (Clone CAT-5H10, Cat. No. 503-2264, Zytomed Systems, Berlin) in einer im Verhältnis 1:400 verdünnten Lösung (Cat. No. ZUC025-500, Zytomed Systems, Berlin).

Material und Methoden

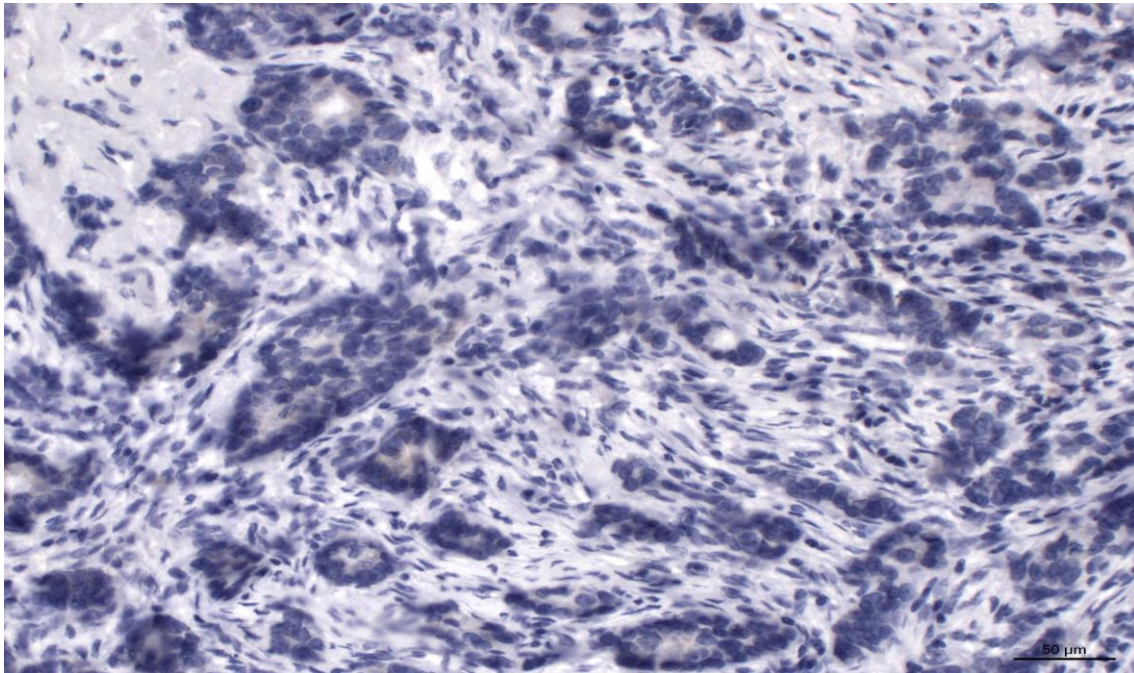


Grafik 6: Schnitt eines TMAs mit β -Catenin-Färbung

Zuvor wurden beide Antikörper auf ihre Spezifität untersucht: Wnt1 zeigte spezifische Proteinbindung an der Positivkontrolle (Mamma-Karzinom) und keine Reaktion an der Negativkontrolle.



Grafik 7: Positivkontrolle Wnt1 an Mamma-Karzinom

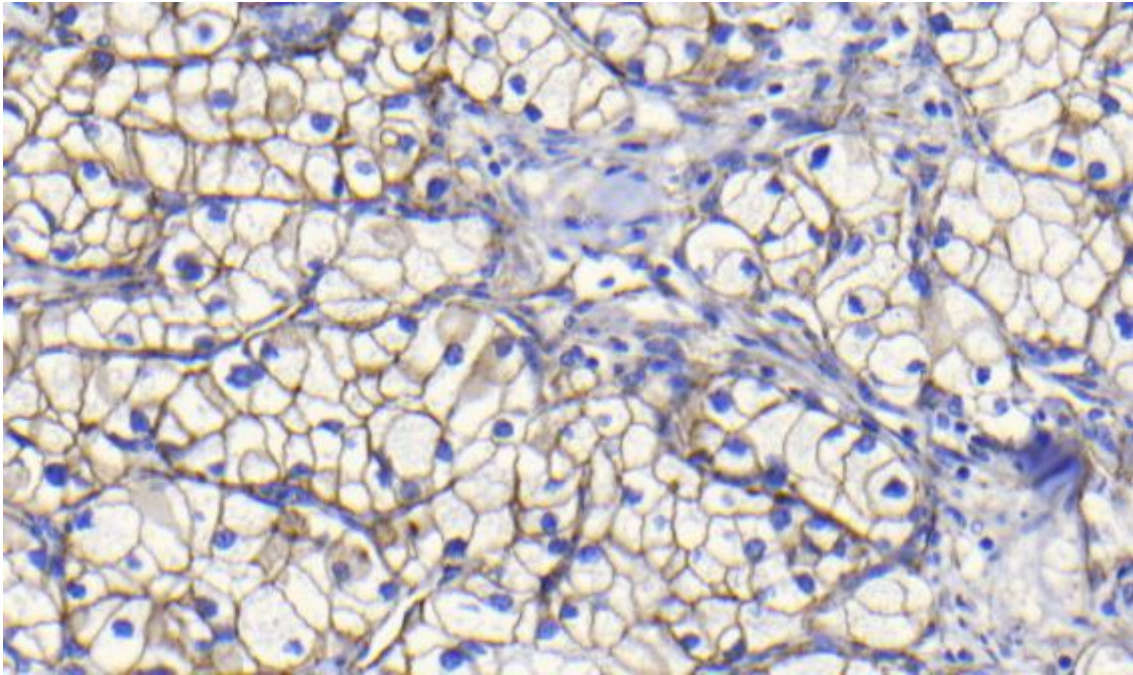


Grafik 8: Negativkontrolle Wnt1 an Mamma-Karzinom

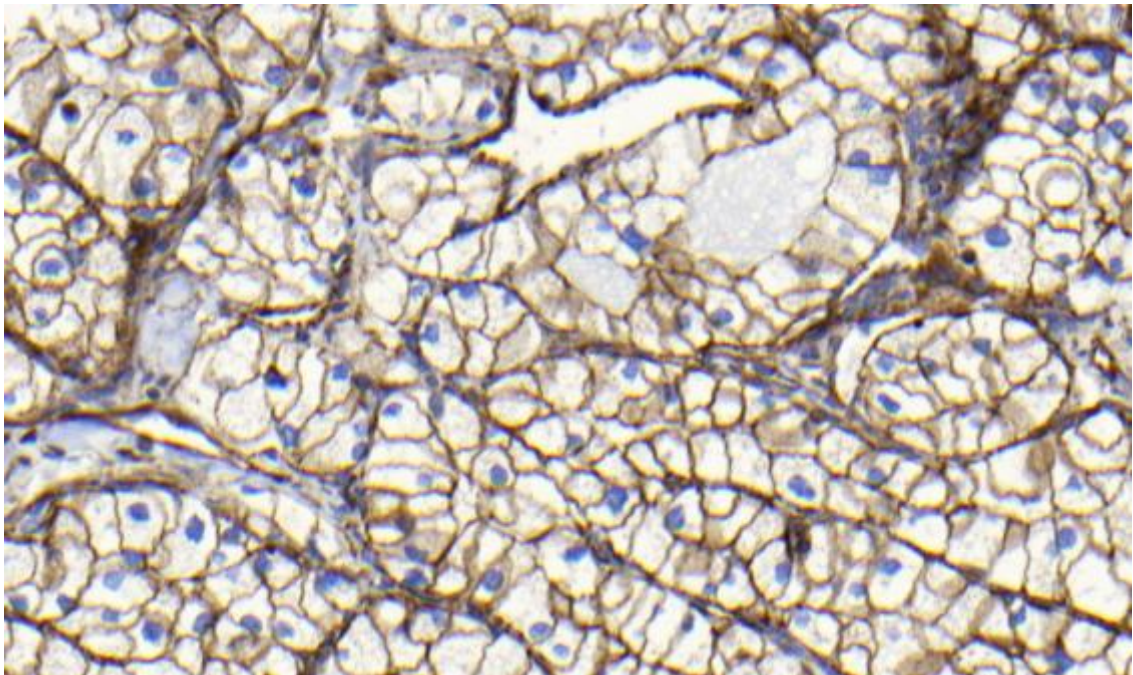
Für den β -Catenin-Antikörper wurde keine gesonderte Färbung zur Positivkontrolle durchgeführt, da dieser am Institut für Pathologie der Universität Tübingen standardisiert und routinemäßig eingesetzt wird und die Färbespezifität mittels interner Kontrolle auf den gefärbten Präparaten überprüft wurde.

Mit dem Ultra View DAB Detection Kit (Cat. No. 760-500, Roche, Basel, Schweiz) wurden die Wnt-Färbungen komplettiert, die β -Catenin-Färbungen mittels iView DAB Detection-Kit (Cat. No. 760-091, Roche, Basel, Schweiz).

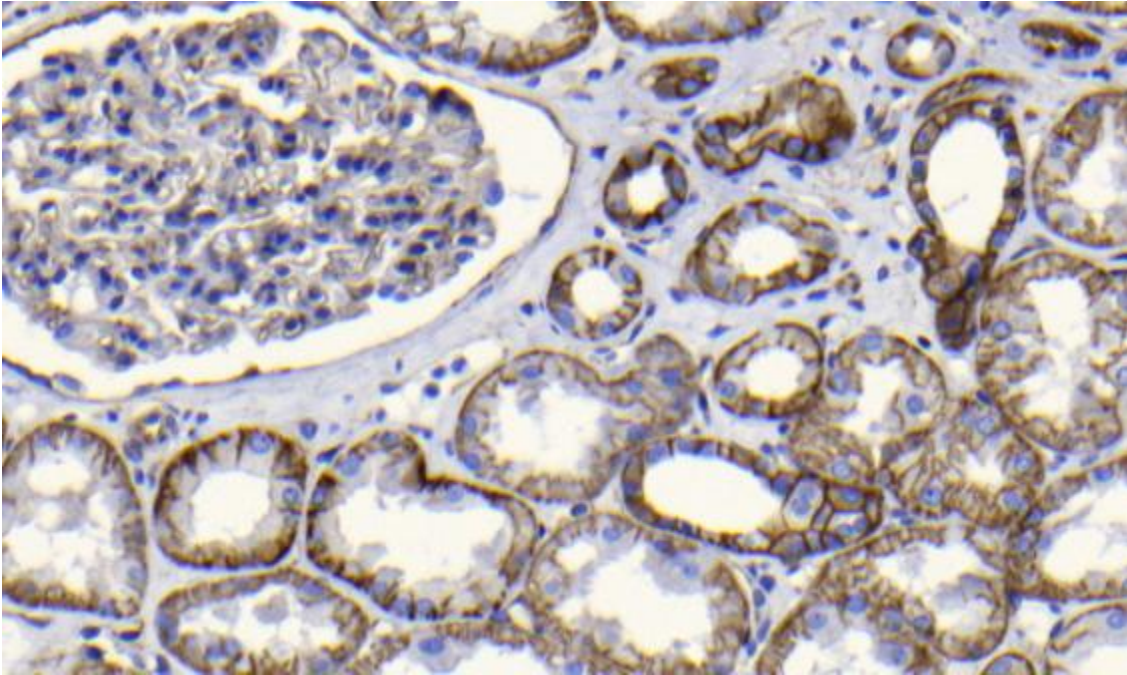
Abschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Um unspezifische, durch Biotin-Kreuzreaktionen verursachte Färbemuster in den Tumorproben auszuschließen wurden an stichprobenartig ausgesuchten Schnitten Kontrollen mit Biotinblocker-Lösung durchgeführt.



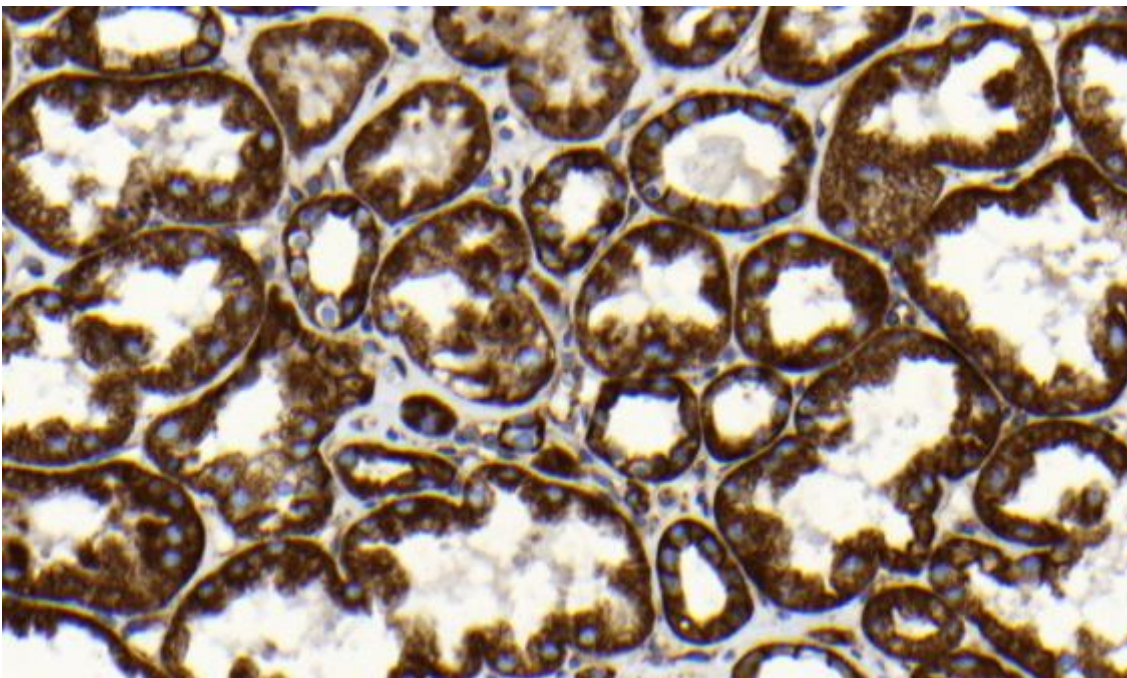
Grafik 9: Biotinblock an Nierenzellkarzinom mit β -Catenin-Färbung, Vergrößerung 15x



Grafik 10: Nierenzellkarzinom mit β -Catenin-Färbung, Vergrößerung 15x



Grafik 11: Biotinblock an benignem Nierengewebe mit β -Catenin-Färbung, Vergrößerung 15x

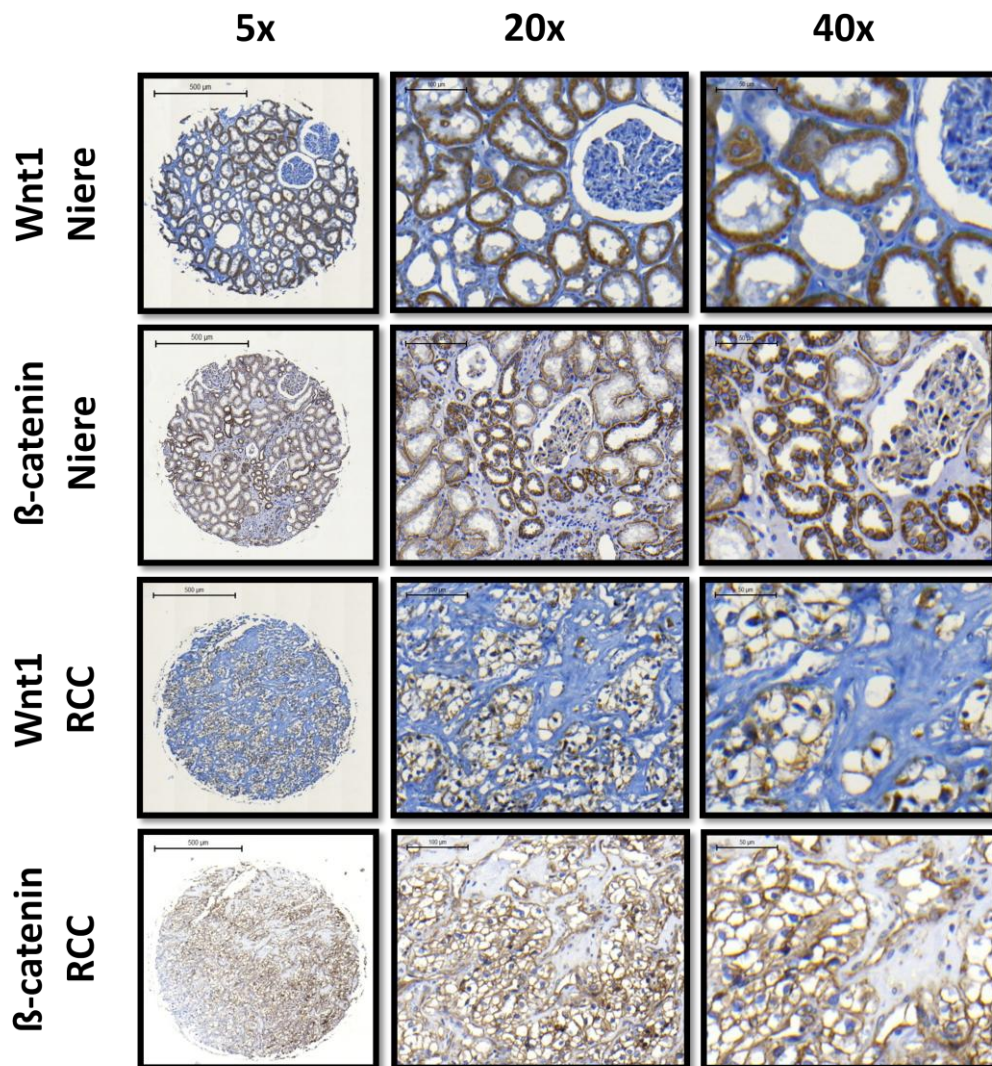


Grafik 12: Benignes Nierengewebe mit β -Catenin-Färbung, Vergrößerung 15x

2.3 Auswertung

2.3.1 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Zur digitalen Auswertung der Immunhistochemie wurden die mit Wnt und β -Catenin gefärbten Objektträger mit dem Mirax-Desk-Scanner (Zeiss) eingescannt. Mit der Mirax-Viewer-Software (Zeiss) konnten alle Scans am Computerbildschirm begutachtet werden. Fragestellungen bei der Auswertung waren sowohl bei Tumor- als auch bei Normalgewebeproben der Grad der Färbung (0=keine, 1=leichte, 2=mäßige, 3=starke Färbung) und wie viel Prozent der Fläche der jeweiligen Tumor- oder Normalgewebprobe durch den Antikörper gefärbt wurde.



Grafik 13: Immunhistochemisch (Wnt1 und β -Catenin) gefärbte Präparate von Normal- und Karzinomgewebe

Für Wnt wurde das Gesamt-Färbemuster berücksichtigt, für β -Catenin wurden die genannten Parameter für zytoplasmatische, membranöse und nukleäre Färbemuster ausgewertet. Fragliche Befunde wurden durch den Pathologen Dr. med. Marcus Scharpf nachbefundet.

Aus dem Färbegrad (0 bis 3) und dem prozentualen Anteil (0 bis 100%) wurde durch Multiplikation ein Expressionsscore von 0 bis 300 errechnet. Rückbezogen auf die Nummerierung der jeweiligen Proben der Arrays wurden die Scores in die Patiententabelle eingetragen, sodass für jeden Patienten von jeweils zwei Tumor- und einer Normalgewebsprobe Scores für die Wnt-Färbung sowie für zytoplasmatische, membranöse und nukleäre β -Catenin-Färbung vorliegen. Im Fall der jeweils zweifach vorliegenden Scores für Tumorgewebe wurde das arithmetische Mittel gebildet und in der weiteren Auswertung der so errechnete Summenscore verwendet.

In der anschließenden statistischen Auswertung konnten dann die einzelnen färbemusterspezifischen Scores mit den oben beschriebenen klinischen Daten korreliert werden.

2.3.2 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden alle Scores als prozentualer Anteil des Maximalwerts von 300 umgerechnet. Da nur bei 18 der 260 diesbezüglich auswertbaren Patienten (6,5%) eine nukleäre β -Catenin-Färbung vorlag, die zudem bezüglich des gefärbten Flächenanteils nur im einstelligen Prozentbereich nachgewiesen werden konnte, wurde diese Färbekategorie nicht mehr als Score erfasst, sondern nur geprüft, ob die jeweilige Probe für eine nukleäre Färbung positiv oder negativ war.

Im Fall einer Normalverteilung der Ergebnisse wurde das arithmetische Mittel mit Standardabweichung angewandt. Lag keine Normalverteilung vor, wurde der Median sowie der IQR (interquartile range, Interquartilsabstand, Differenz aus 75%- und 25%-Quartile) angegeben. Variablen, die sich in Kategorien einteilen ließen, wurden mit absoluten und relativen Frequenzen angegeben.

Die Expressionsscores für Wnt und zytoplasmatische bzw. membranöse β -Catenin-Färbung der korrespondierenden malignen und benignen

Material und Methoden

Gewebeproben wurden nach der Umrechnung in prozentuale Anteile des Maximalscores mittels nichtparametrischem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test miteinander verglichen.

Am arithmetischen Mittel von 40,0% (Wnt1), 69,0% (β -Catenin membranös) bzw. 37,5% (β -Catenin zytoplasmatisch) orientiert wurden Untergruppen für niedrige (\leq arithmetisches Mittel) und hohe ($>$ arithmetisches Mittel) Expression eingeteilt. Anhand der Expressions-Untergruppen wurden mittels zweiseitigem exakten Fisher-Test die Korrelationsanalysen für die klinischen Daten durchgeführt.

Für Patienten, die noch am Leben sind, wurde der Zeitpunkt des letzten Follow-ups festgehalten und diese zu diesem Zeitpunkt zensiert. Zur Analyse des CSS wurden alle nicht an der Krebserkrankung verstorbenen Patienten ab ihrem Sterbedatum von der Analyse zensiert. Die sich auf die Überlebenszeiten beziehenden Funktionen wurden nach Kaplan-Meier berechnet, unterschiedliche Ergebnisse wurden durch Anwendung des Logrank-Tests verglichen.

Abhängig von einem Cox-proportional-Hazard-Regressionsmodell wurden die uni- und multivariaten prädiktiven Risiken der einzelnen Variablen, bezogen auf die Unterscheidung von krebspezifisch und nicht krebspezifisch verstorbenen Patienten, bestimmt. Ein zweiseitiger Wahrscheinlichkeitswert von $<0,05$ (p-Wert) wurde als signifikant definiert, ohne dass signifikante Ergebnisse als eindeutige Bestätigung der Ergebnisse herangezogen werden können. Die gesamte Datenauswertung erfolgte mit dem „Statistical Package for Social Sciences Software“, Version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).¹⁴⁰

3. Ergebnisse

3.1 Eigenschaften des Patientenkollektivs

Im Durchschnitt waren die Patienten $62,2 \pm 12,5$ (MW \pm SD) Jahre alt, wobei 69,8% männlichen und 30,2% weiblichen Geschlechts waren. In der T1-Gruppe (T1a, T1b) mit weniger fortgeschrittener Erkrankung fanden sich 60,8% der Patienten, 39,2% der Patienten wiesen ein fortgeschrittenes T3-Tumorstadium (T3a, T3b, T3c) auf. 113 (41,4%) Patienten waren zum Zeitpunkt der Auswertung nicht mehr am Leben, 65 (23,8%) verstarben aufgrund ihres Nierenzellkarzinoms. Weitere Patientencharakteristika sind in Tabelle 7 zusammengefasst:

| Parameter | Anteil Patienten, n=278 |
|--|-------------------------|
| Durchschnittsalter in Jahren (\pm SD) | 62,2 (\pm 12,5) |
| Geschlecht männlich/weiblich (%) | 194/84 (69,8/30,2) |
| Gesamtzahl Todesfälle (%) | 113 (41,4) |
| RCC-abhängige Todesfälle (%) | 65 (23,8) |
| Durchschnittlicher Tumordurchmesser (\pm SD) in cm | 5,26 (\pm 2,91) |
| Stadium T1/T3 (%) | 169/109 (60,8/39,2) |
| Lymphknoteninvasion N0/N1+2 (%) | 265/13 (95,3/4,7) |
| Fernmetastasen M0/M1 (%) | 239/39 (86,0/14,0) |
| Grading nach Fuhrman G1+2/G3+4 | 234/44 |

| | |
|--|-------------|
| (%) | (84,2/15,8) |
| Gefäßinvasion neg./pos. | 193/85 |
| (%) | (69,4/30,6) |
| Perirenale und -pelvine Fettgewebsinvasion | 47 |
| (%) | (16,9) |
| Invasion ins perihiläre Fettgewebe | 65 |
| (%) | (23,4) |
| Tumornekrose | 114 |
| (%) | (41,0) |
| Sarkomatoide Tumorzellen | 19 |
| (%) | (6,8) |

Tabelle 7: Patientencharakteristika

3.2 Analyse der immunhistochemischen Proteinexpression für Wnt1

Eine immunhistochemische Färbung mit dem verwendeten Wnt1-Antikörper ließ sich in den Tumorproben vor allem im Zytoplasma der proximalen Tubuluszellen nachweisen. Insgesamt zeigte sich im malignen Gewebe ($31,0 \pm 23,5\%$; $p < 0,0001$) eine im Vergleich zum Normalgewebe ($52,2 \pm 22,6\%$) reduzierte Expression von Wnt1.

Die mittels zweiseitigem exakten Fisher-Test durchgeführten Korrelationsanalysen zwischen klinischen Parametern und hoher ($>40,0\%$) bzw. niedriger ($\leq 40,0\%$) Wnt1-Expression lieferten folgende signifikante ($p < 0,05$) Ergebnisse: Höhere Expressionen von Wnt1 sind mit größeren Tumordurchmessern ($p = 0,01$), fortgeschrittenem Tumorstadium ($p = 0,004$) und erhöhtem Risiko für gefäßinfiltrierendes Tumorwachstum ($p = 0,02$) verknüpft. Tabelle 8 zeigt die errechneten signifikanten und nicht signifikanten Korrelationen:

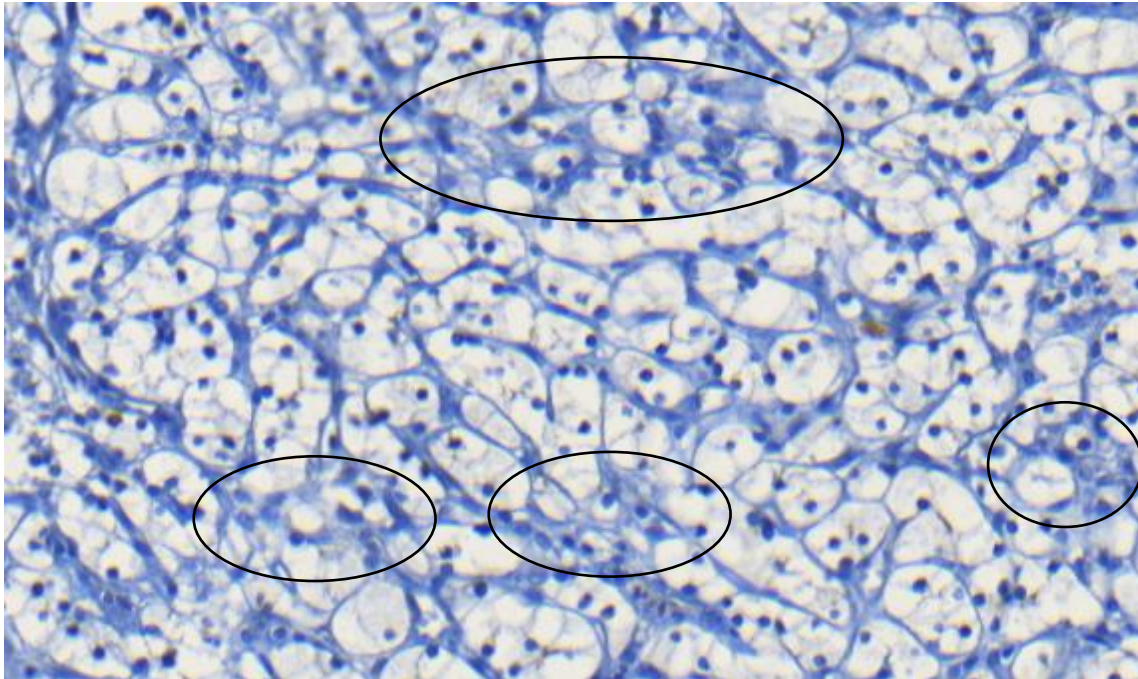
Ergebnisse

| Parameter | Wnt1 ≤40,0% (n=165) | Wnt1 >40,0% (n=106) | p-Wert |
|--|-------------------------|------------------------|--------|
| Durchschnittsalter in Jahren (± SD) | 61,4 (±12,9) | 63,9 (±11,6) | 0,12 |
| Geschlecht männlich/weiblich (%) | 108/57 (65,5/34,5) | 80/26 (75,5/24,5) | 0,08 |
| Gesamtzahl Todesfälle (%) | 66 (59,5) | 45 (40,5) | 0,80 |
| RCC-abhängige Todesfälle (%) | 41 (64,1) | 23 (35,9) | 0,56 |
| Durchschnittlicher Tumordurchmesser (± SD) in cm | 4,9 (±2,6) | 5,8 (±3,0) | 0,01 |
| Stadium T1/T3 (%) | 114/51 (69,1/30,9) | 50/56 (47,2/52,8) | 0,004 |
| Lymphknoteninvasion N0/N1+2 (%) | 157/8 (95,2/4,8) | 101/5 (95,3/4,7) | 1,0 |
| Fernmetastasen M0/M1 (%) | 140/25 (84,85/15,15) | 93/13 (86,0/14,0) | 0,59 |
| Grading nach Fuhrman G1+2/G3+4 (%) | 136/29 (82,0/17,6) | 92/14 (86,8/13,2) | 0,40 |
| Gefäßinvasion neg./pos. (%) | 124/41 (75,15/24,85) | 64/42 (60,4/39,6) | 0,02 |
| Perirenale und -pelvine Fettgewebsinvasion (%) | 157/8 (95,1/4,9) | 94/12 (88,7/11,3) | 0,06 |
| Invasion ins perihiläre Fettgewebe (%) | 143/22 (86,7/13,3) | 89/17 (84,0/16,0) | 0,60 |
| Tumornekrose | 100/65 | 59/47 | 0,45 |

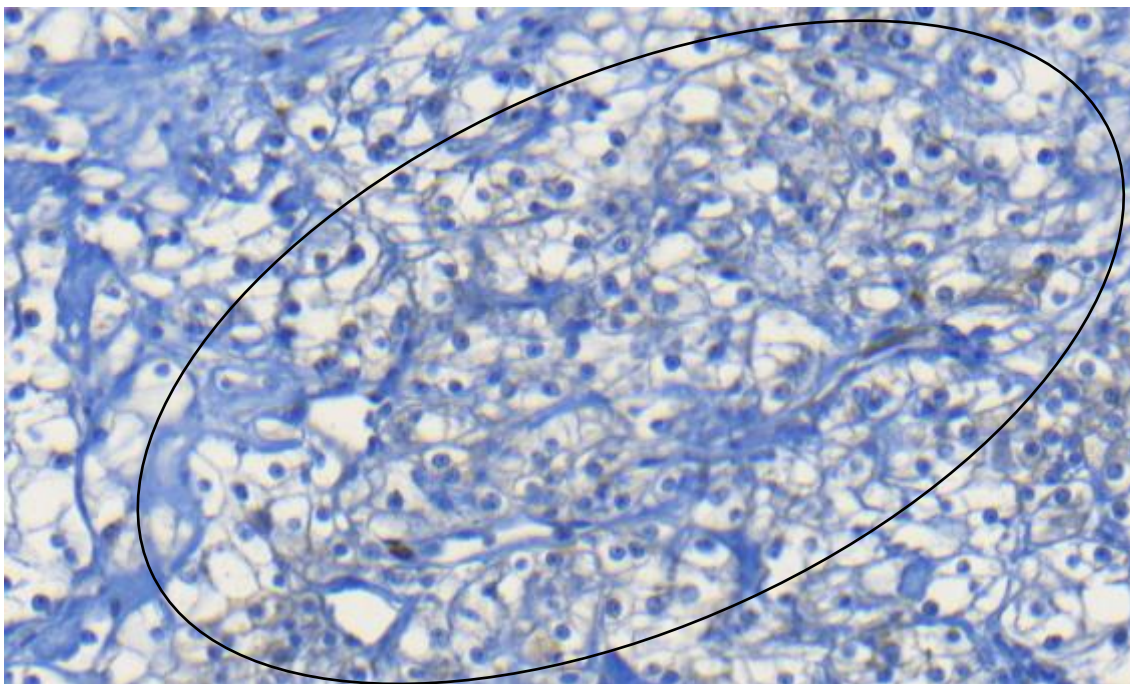
Ergebnisse

| | | | |
|---------------------------------|----------------------|---------------------|------|
| (%) | (60,6/39,4) | (55,7/44,3) | |
| Sarkomatoide Tumorzellen (%) | 152/13 (92,1/7,9) | 100/6 (93,0/7,0) | 0,63 |

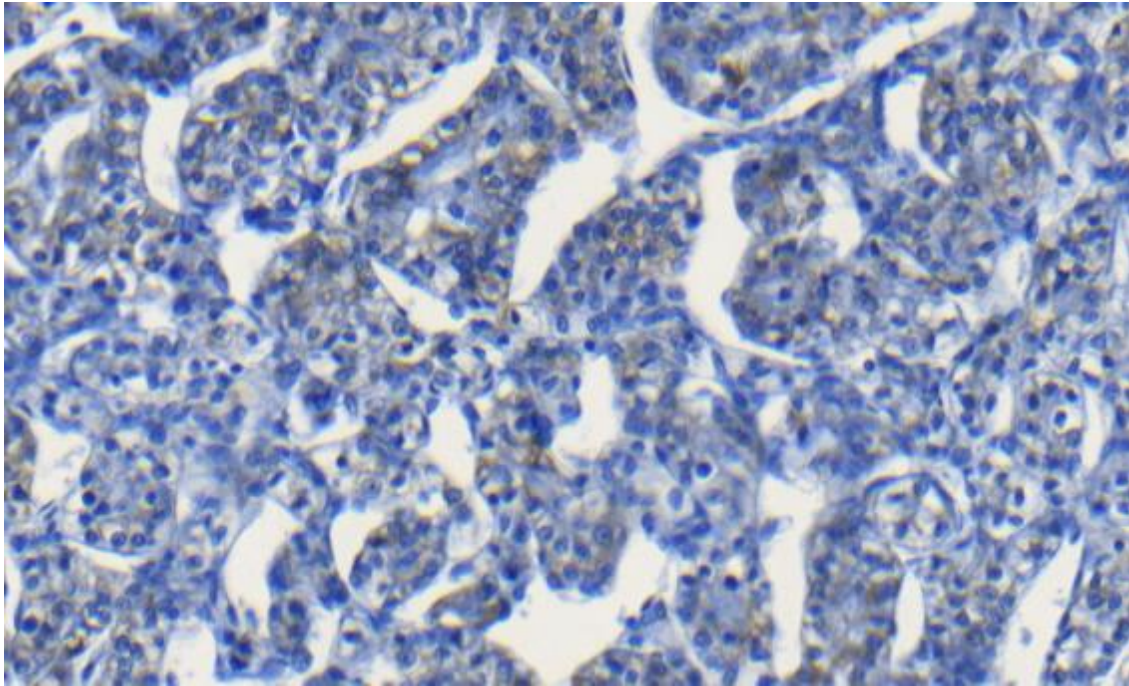
Tabelle 8: Korrelationen Wnt1



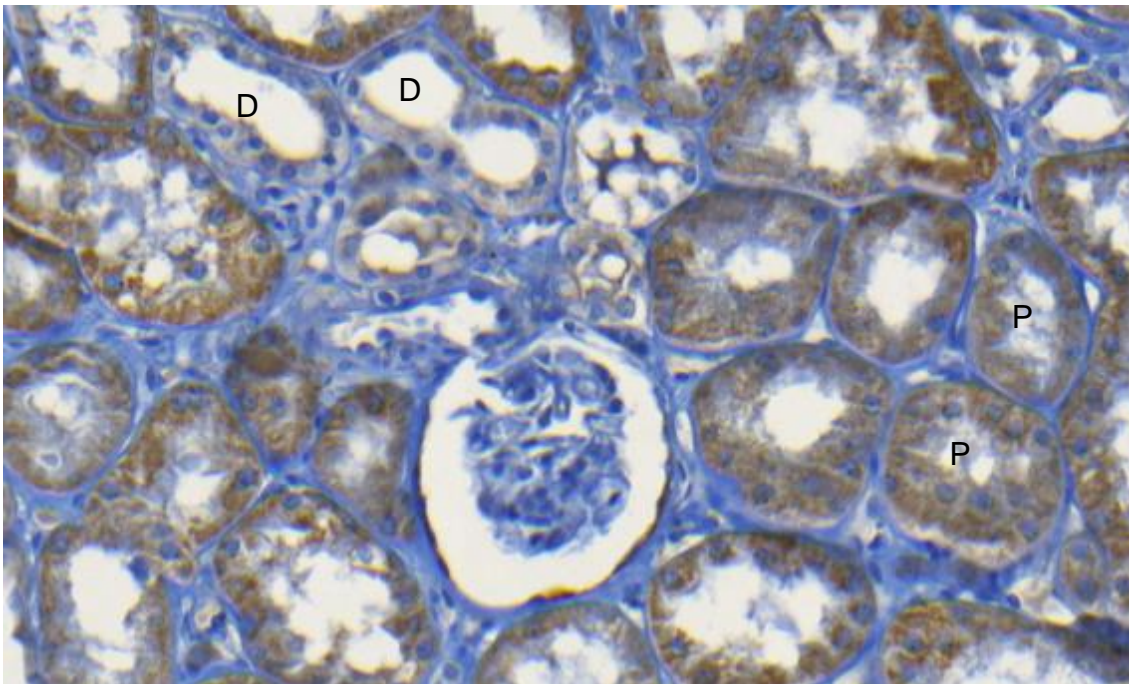
Grafik 14: Wnt1-Färbung mit schwacher Färbung (Grad 1), Vergrößerung 15x



Grafik 15: Wnt1-Färbung mit mäßiger Färbung (Grad 2), Vergrößerung 15x



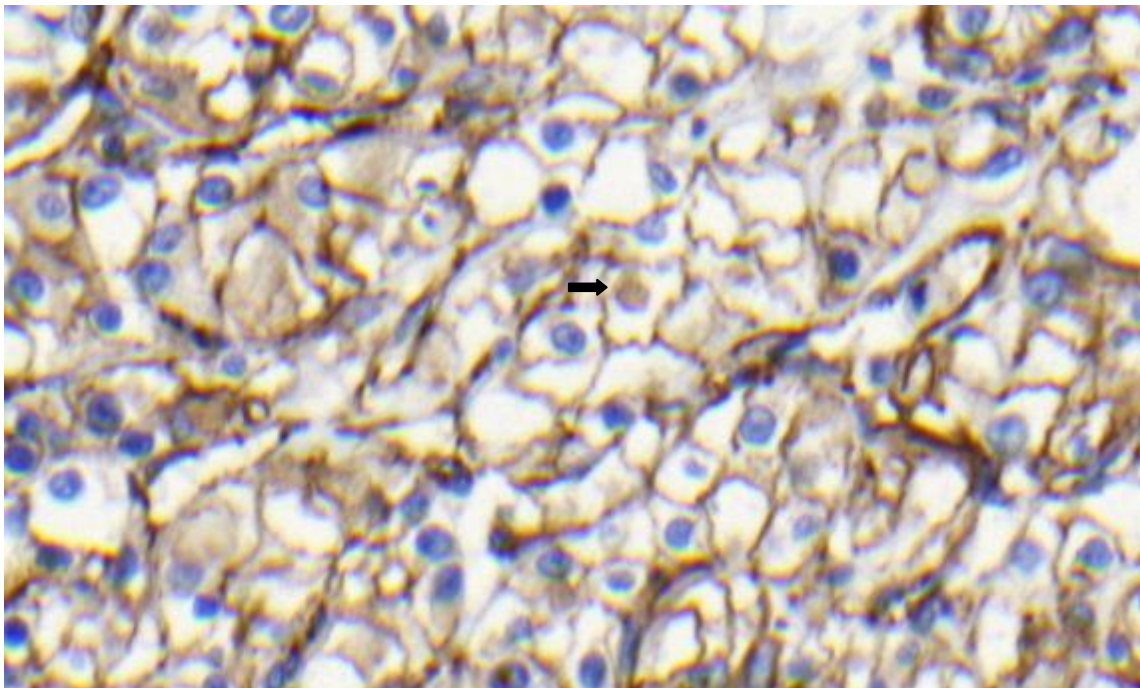
Grafik 16: Wnt1-Färbung mit starker Färbung (Grad 3), Vergrößerung 15x



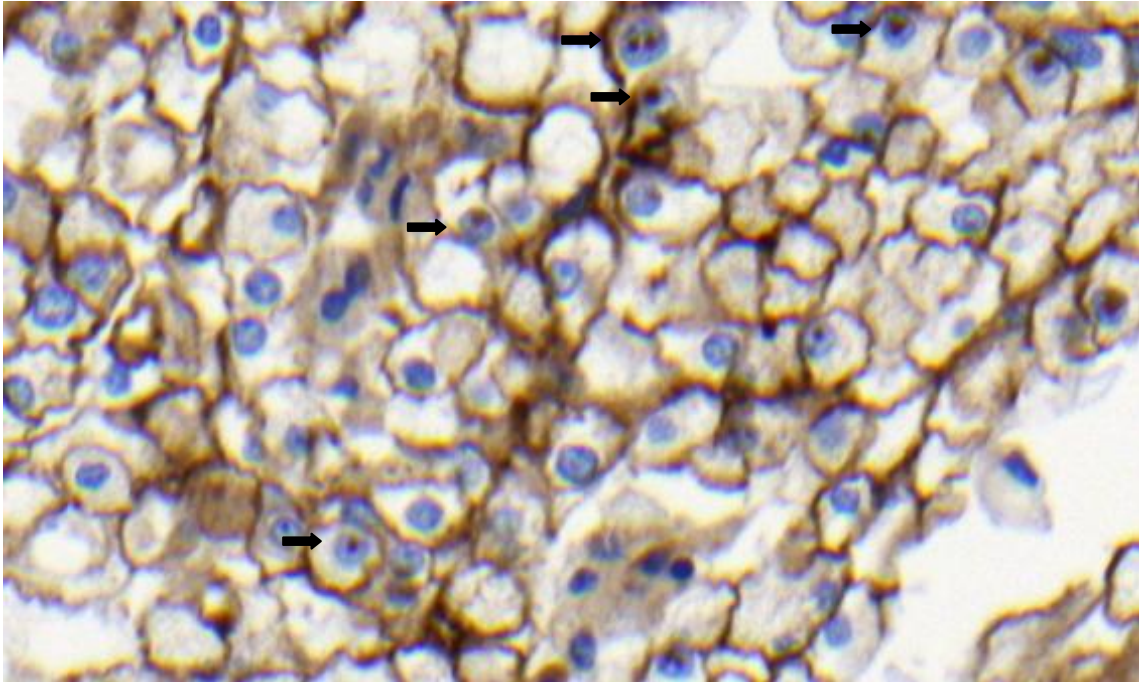
Grafik 17: Wnt1-Färbung an Normalgewebe, Vergrößerung 15x. P=proximaler Tubulus, D=distaler Tubulus

3.3 Analyse der immunhistochemischen Proteinexpression für β -Catenin

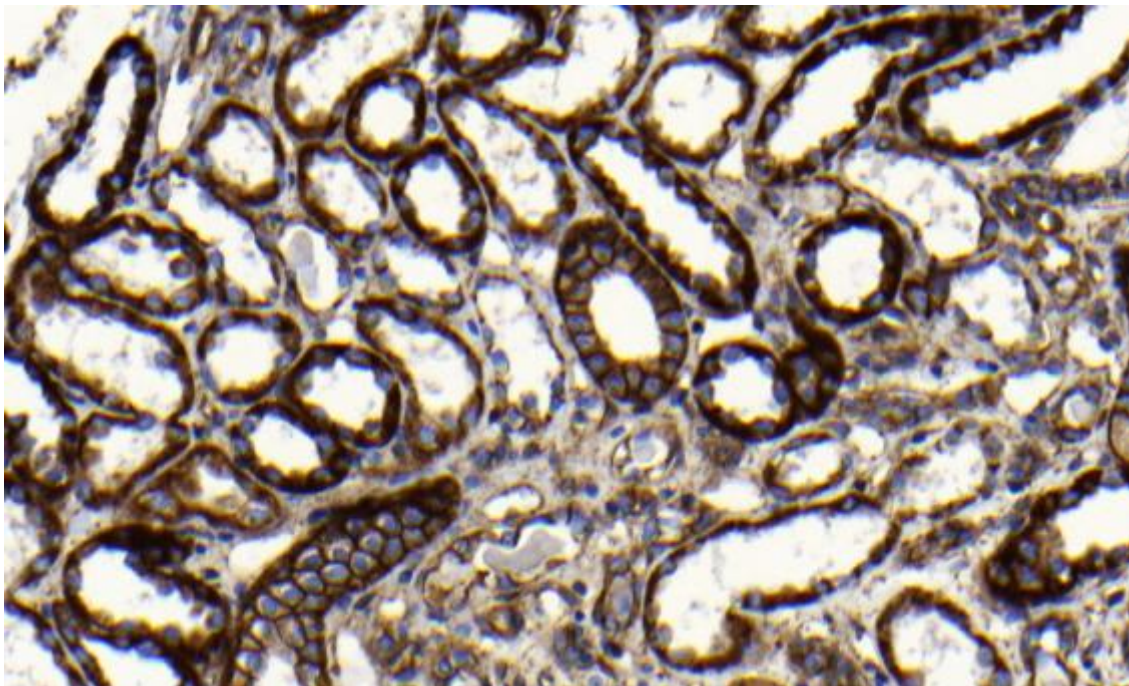
Der β -Catenin-Antikörper färbte in erster Linie Zellmembranen und Zytoplasmen sowohl der Tumorproben als auch des Normalgewebes. Eine Färbung des Zellkerns ließ sich nur in 18 von 260 Tumorproben (6,5%) in sehr geringer Ausprägung (<5% der Tumorzellen) nachweisen, im Normalgewebe fand sich keine nukleäre Färbung.



Grafik 18: einzelner Zellkern mit β -Catenin-Färbung in der Bildmitte (Pfeil), Vergrößerung 30x



Grafik 19: mehrere Zellkerne mit β -Catenin-gefärbten Nukleolen (Pfeile), Vergrößerung 30x



Grafik 20: β -Catenin-Färbung Normalgewebe, Vergrößerung 15x

3.3.1 Membranöse β -Catenin-Färbung

Die Analyse der membranösen β -Catenin-Färbung ergab verglichen mit den Tumorproben ($55,8 \pm 15,8\%$) eine im Normalgewebe erhöhte Färbeintensität ($60,6 \pm 12,8\%$; $p=0,47$).

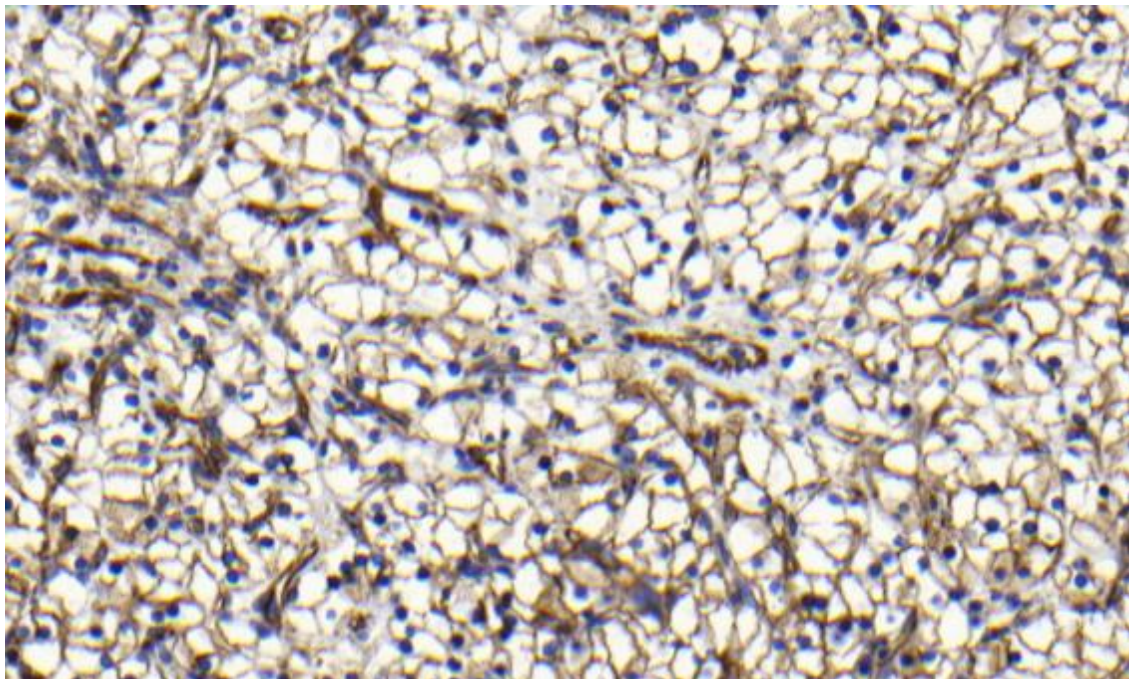
Im durchgeführten exakten Fisher-Test ergaben sich signifikante Korrelationen zwischen klinischen Parametern und hoher ($>69,0\%$) bzw. niedriger ($\leq 69,0\%$) membranöser Expression von β -Catenin: Eine Überexpression membranösen β -Catenins ist mit höherem Tumorstadium ($p=0,03$), höherem Grading ($p=0,04$), gefäßinfiltrierendem Tumorwachstum ($p=0,01$) und dem Auftreten von Tumornekrose ($p=0,04$) assoziiert. Weitere Korrelationen können Tabelle 9 entnommen werden.

| Parameter | β -Catenin membranös $\leq 69,0\%$ (n=186) | β -Catenin membranös $>69,0\%$ (n=70) | p-Wert |
|---|---|--|--------|
| Durchschnittsalter in Jahren (\pm Standardabweichung, SD) | 61,8 ($\pm 12,6$) | 64,2 ($\pm 12,3$) | 0,17 |
| Geschlecht männlich/weiblich (%) | 134/52 (72,0/28,0) | 43/27 (61,4/38,6) | 0,11 |
| Gesamtzahl Todesfälle (%) | 72 (67,9) | 34 (32,1) | 0,20 |
| RCC-abhängige Todesfälle (%) | 39 (66,1) | 20 (33,9) | 0,24 |
| Durchschnittlicher Tumordurchmesser (\pm SD) in cm | 5,3 ($\pm 2,8$) | 5,4 ($\pm 2,8$) | 0,87 |
| Stadium T1/T3 (%) | 119/67 (64,0/36,0) | 34/36 (48,6/61,4) | 0,03 |
| Lymphknoteninvasion N0/N1+2 (%) | 180/6 (96,8/3,2) | 64/6 (91,4/8,6) | 0,10 |

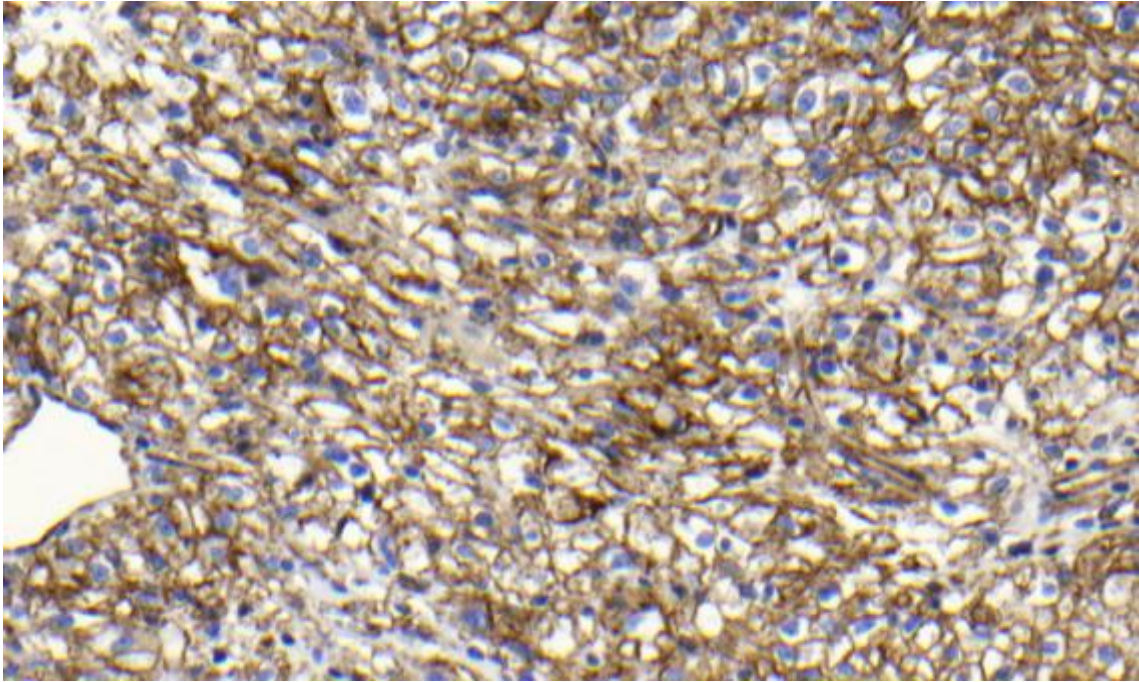
Ergebnisse

| | | | |
|--|-----------------------|----------------------|------|
| Fernmetastasen M0/M1 (%) | 159/27 (85,5/14,5) | 61/9 (87,1/12,9) | 0,84 |
| Grading nach Fuhrman G1+2/G3+4 (%) | 162/24 (87,1/12,9) | 53/17 (75,7/24,3) | 0,04 |
| Gefäßinvasion neg./pos. (%) | 137/49 (73,7/26,3) | 39/31 (55,7/44,3) | 0,01 |
| Perirenale und -pelvine Fettgewebsinvasion (%) | 171/15 (91,9/8,1) | 66/4 (94,3/5,7) | 0,60 |
| Invasion ins perihiläre Fettgewebe (%) | 157/29 (84,4/15,6) | 62/8 (88,6/11,4) | 0,55 |
| Tumornekrose (%) | 114/72 (61,3/38,7) | 33/37 (47,1/52,9) | 0,04 |
| Sarkomatoide Tumorzellen (%) | 175/11 (94,1/5,9) | 63/7 (93,0/7,0) | 0,28 |

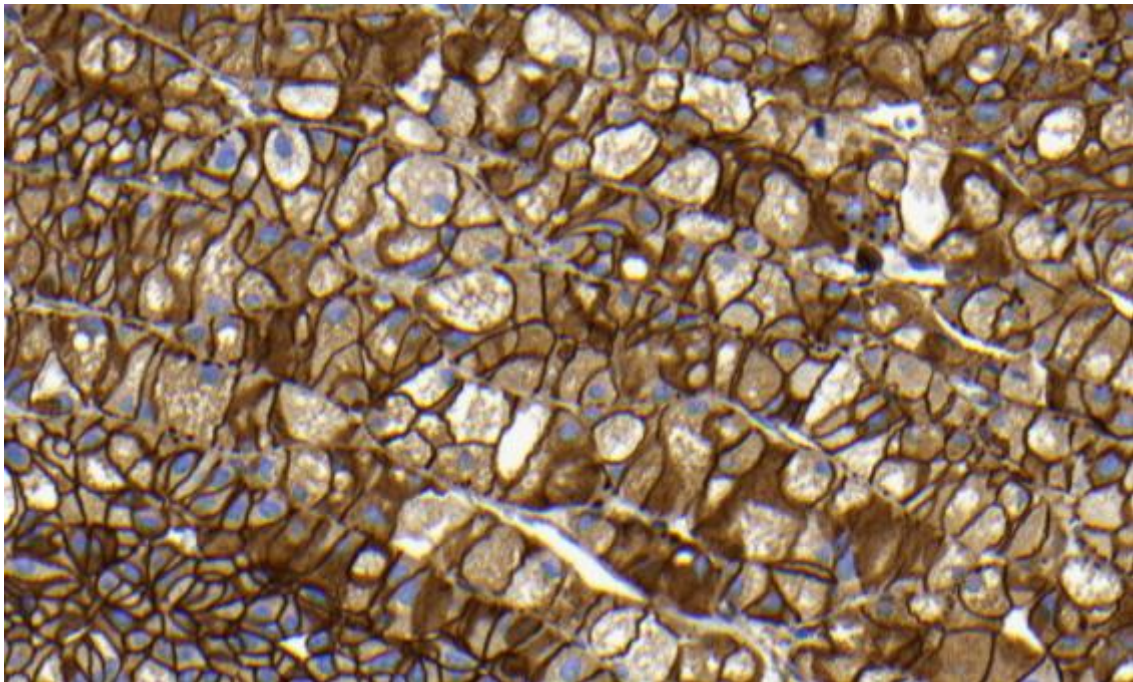
Tabelle 9: Korrelationen β -Catenin membranös



Grafik 21: β -Catenin-Färbung mit schwacher membranöser Färbung (Grad 1), Vergrößerung 15x



Grafik 22: β -Catenin-Färbung mit mäßiger membranöser Färbung (Grad 2), Vergrößerung 15x



Grafik 23: β -Catenin-Färbung mit starker membranöser Färbung (Grad 3), Vergrößerung 15x

3.3.2 Zytoplasmatische β -Catenin-Färbung

Auch für zytoplasmatisches β -Catenin zeigte sich eine im Normalgewebe ($43,2 \pm 14,3\%$) stärkere Färbung als im Tumorgewebe ($38,8 \pm 13,5\%$; $p=0,25$).

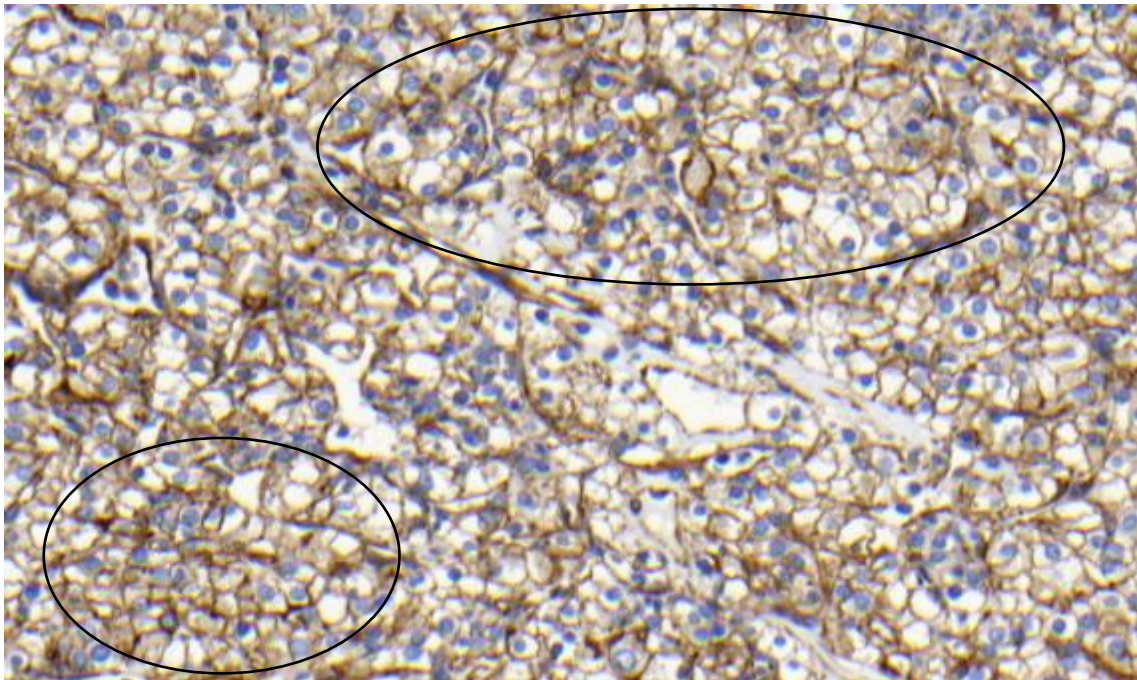
Die Korrelationsanalyse zeigte signifikante Korrelationen zwischen überdurchschnittlicher zytoplasmatischer β -Catenin-Färbung ($>37,5\%$) und größeren Tumoren ($p=0,01$), höherem Tumorstadium ($p=0,003$), Infiltration von Lymphknoten ($p=0,04$), höherem Grade nach Fuhrman ($p \leq 0,001$), gefäßinfiltrierendem Tumorwachstum ($p=0,002$) sowie sarkomatoider Entdifferenzierung der Tumorzellen ($p=0,01$). Signifikante und nicht signifikante Korrelationen zu anderen Parametern sind in Tabelle 10 ersichtlich.

| Parameter | β -Catenin zytoplasmatisch $\leq 37,5\%$ (n=225) | β -Catenin zytoplasmatisch $> 37,5\%$ (n=31) | p-Wert |
|---|---|---|--------|
| Durchschnittsalter in Jahren (\pm Standardabweichung, SD) | 62,2 ($\pm 12,7$) | 64,1 ($\pm 11,7$) | 0,57 |
| Geschlecht männlich/weiblich (%) | 157/68 (69,8/30,2) | 20/11 (64,5/35,5) | 0,56 |
| Gesamtzahl Todesfälle (%) | 89 (84,0) | 17 (16,0) | 0,11 |
| RCC-abhängige Todesfälle (%) | 47 (79,7) | 12 (20,3) | 0,04 |
| Durchschnittlicher Tumordurchmesser (\pm SD) in cm | 5,2 ($\pm 2,7$) | 6,4 ($\pm 2,9$) | 0,01 |
| Stadium T1/T3 (%) | 144/81 (64,0/36,0) | 9/22 (29,0/71,0) | 0,003 |
| Lymphknoteninvasion N0/N1+2 (%) | 217/8 (96,4/3,6) | 27/4 (87,1/12,9) | 0,04 |
| Fernmetastasen M0/M1 | 193/32 | 27/4 | 1,0 |

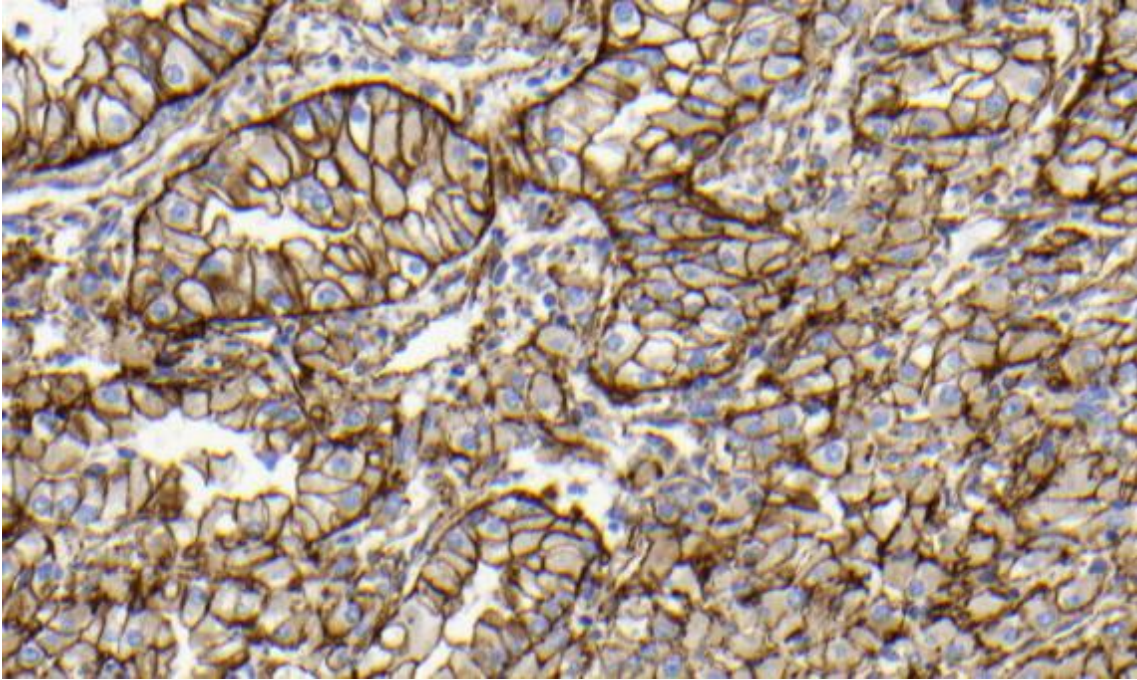
Ergebnisse

| | | | |
|--|-----------------------|-----------------------|--------|
| (%) | (85,8/14,2) | (87,1/12,9) | |
| Grading nach Fuhrman G1+2/G3+4 (%) | 199/26 (88,4/11,6) | 16/15 (51,6/48,4) | ≤0,001 |
| Gefäßinvasion neg./pos. (%) | 163/62 (72,4/27,6) | 13/18 (41,9/58,1) | 0,002 |
| Perirenale und -pelvine Fettgewebsinvasion (%) | 208/17 (92,4/7,6) | 29/2 (93,55/6,45) | 1,0 |
| Invasion ins perihiläre Fettgewebe (%) | 194/31 (86,2/13,8) | 25/6 (80,65/19,35) | 0,42 |
| Tumornekrose (%) | 133/92 (59,1/40,9) | 14/17 (45,2/54,8) | 0,18 |
| Sarkomatoide Tumorzellen (%) | 213/12 (94,7/5,3) | 25/6 (80,65/19,35) | 0,01 |

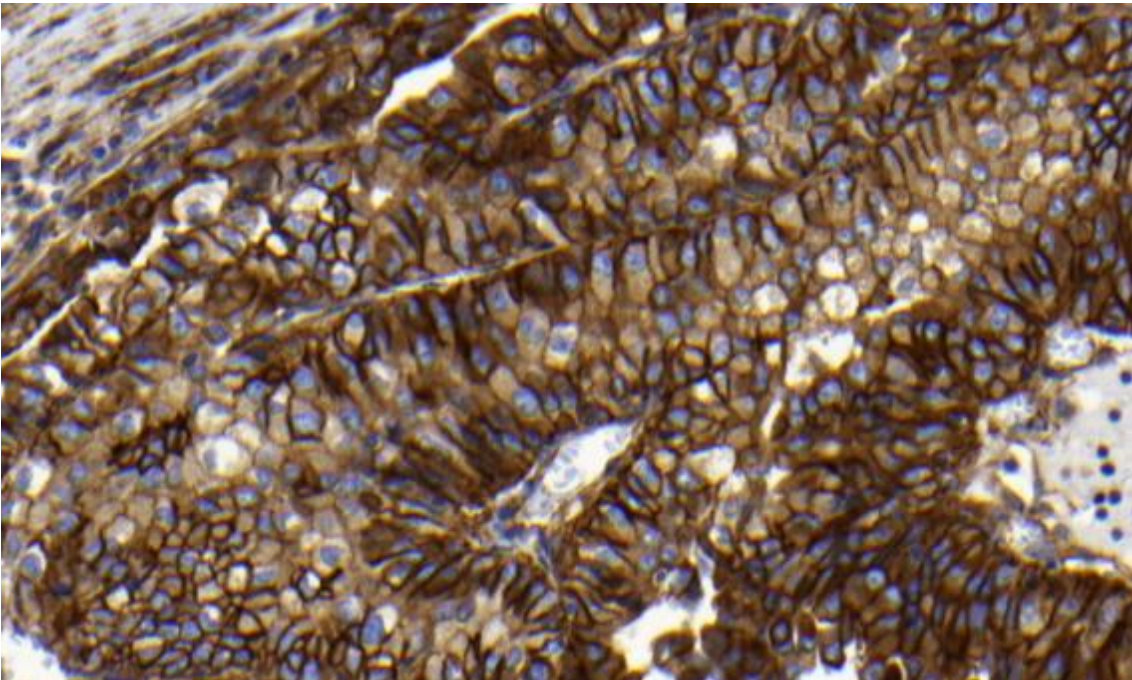
Tabelle 10: Korrelationen β-Catenin zytoplasmatisch



Grafik 24: β-Catenin-Färbung mit schwacher zytoplasmatischer Färbung (Grad 1, Markierungen), Vergrößerung 15x



Grafik 25: β -Catenin-Färbung mit mäßiger zytoplasmatischer Färbung (Grad 2), Vergrößerung 15x



Grafik 26: β -Catenin-Färbung mit starker zytoplasmatischer Färbung (Grad 3), Vergrößerung 15x

3.3.3 Nukleäre β -Catenin-Färbung

Die zur Wnt1- sowie zu membranöser und zytoplasmatischer β -Catenin-Färbung analog durchgeführten Berechnungen und Korrelationsanalysen ergaben für nukleäre β -Catenin-Färbemuster keine signifikanten Ergebnisse und werden im Folgenden nicht aufgelistet oder weiter berücksichtigt.

3.4 Analyse der Langzeitüberlebensdaten

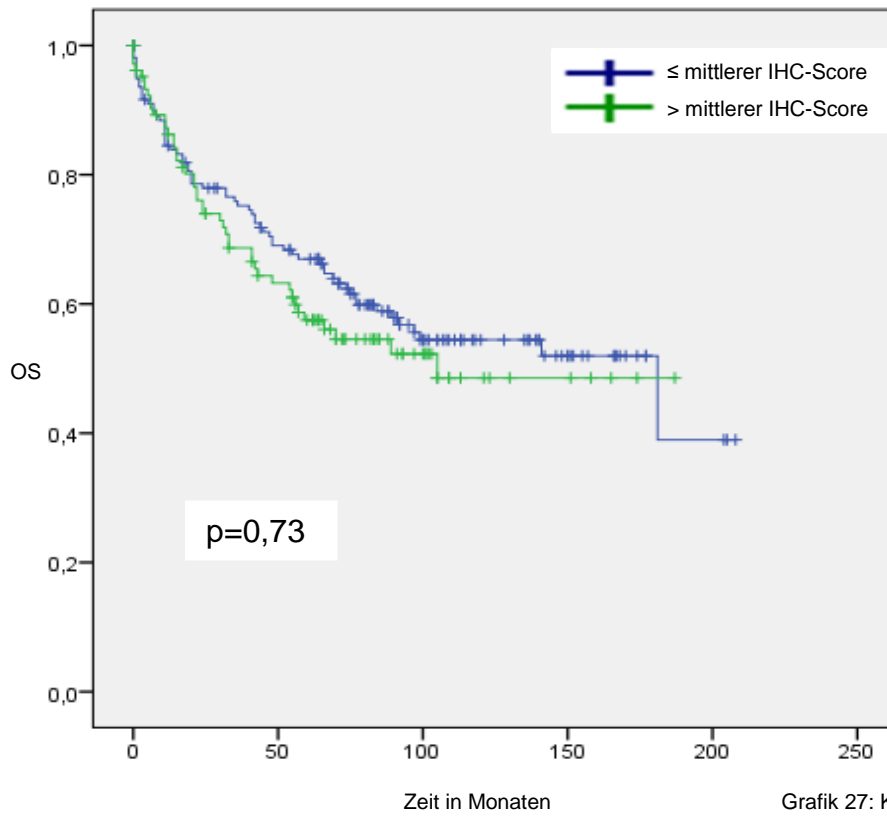
Das mediane Follow-up der Patienten lag bei 65 Monaten (IQR 20-100). Von den 278 Patienten waren zum Zeitpunkt der Auswertung noch 165 (59,4%) am Leben, 65 (23,8%) waren aufgrund des Nierenzellkarzinoms verstorben, 48 (17,3%) wegen anderer Ursachen.

3.4.1 Korrelationen von Wnt1 und β -Catenin zu Gesamtüberleben (OS) und krebsspezifischer Überlebensrate (CSS)

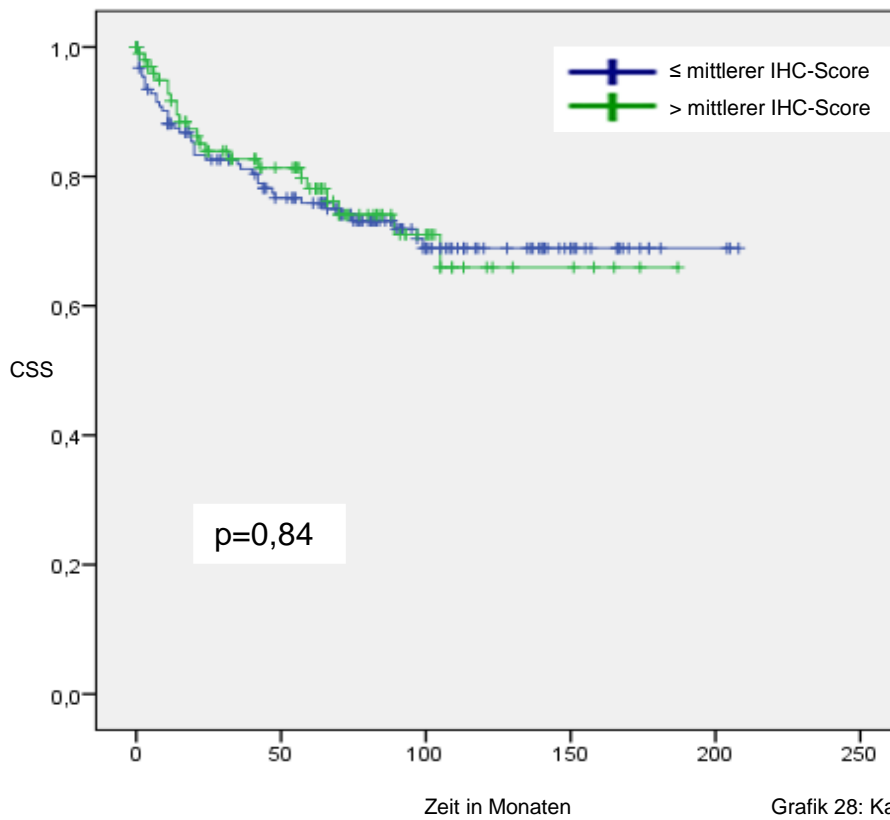
Der Logrank-Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen niedriger und hoher Wnt1-Expression:

| | Wnt1 \leq 40,0% | Wnt1 $>$ 40,0% | p-Wert |
|-------------------------|------------------------|------------------------|--------|
| Medianes OS in Monaten | 124,9 (109,7-140,2) | 109 (92,1-125,9) | 0,73 |
| Medianes CSS in Monaten | 153,8 (139,7-167,9) | 138,9 (121,6-156,2) | 0,84 |

Tabelle 11: Korrelationen Wnt1 zu OS und CSS



Grafik 27: Kaplan-Meier-Kurve OS Wnt1

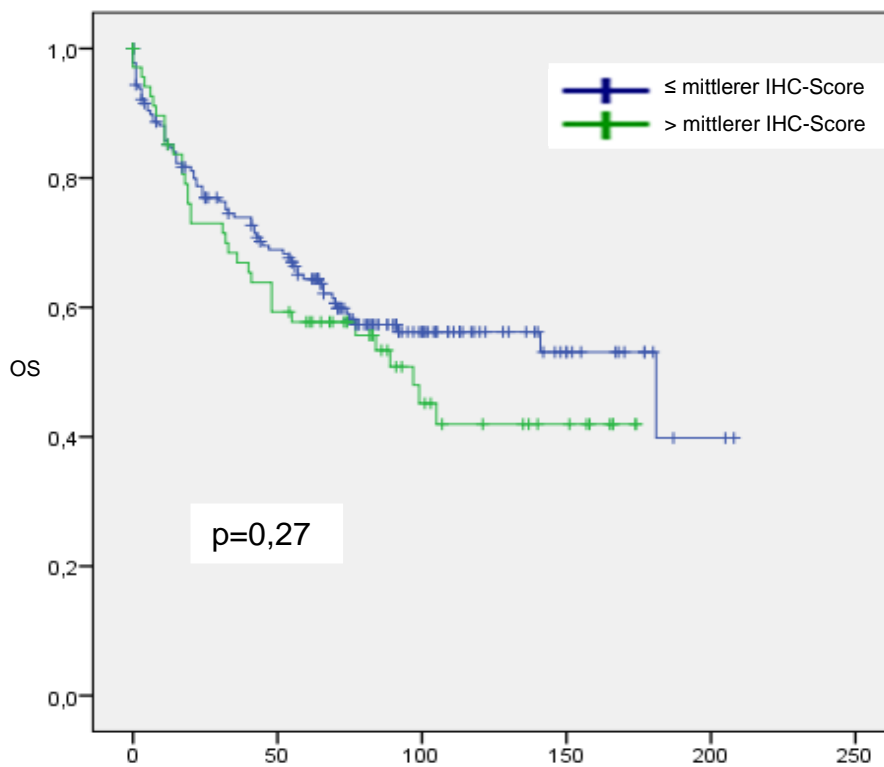


Grafik 28: Kaplan-Meier-Kurve CSS Wnt1

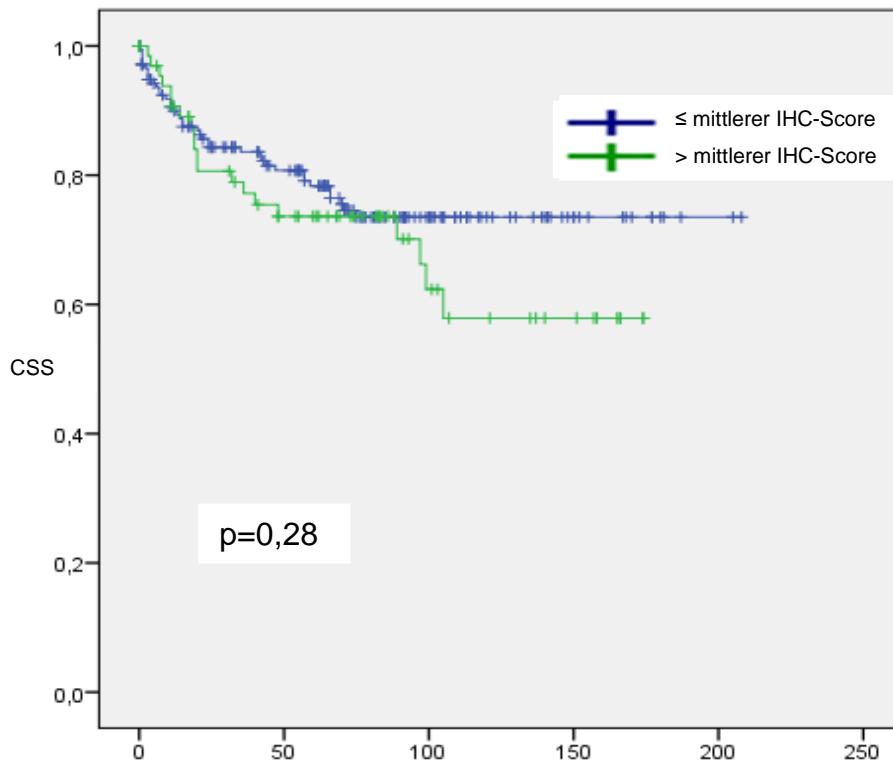
Auch für niedrige bzw. hohe membranöse β -Catenin-Expression konnten keine signifikanten Unterschiede im OS bzw. CSS nachgewiesen werden:

| | β -Catenin membranös $\leq 69,0\%$ | β -Catenin membranös $> 69,0\%$ | p-Wert |
|-------------------------|--|---------------------------------------|--------|
| Medianes OS in Monaten | 125,2 (110,3-140,0) | 97,1 (79,2-115,0) | 0,27 |
| Medianes CSS in Monaten | 160,7 (147,8-173,7) | 121,4 (102,8-140,0) | 0,28 |

Tabelle 12: Korrelationen β -Catenin membranös OS und CSS



Zeit in Monaten Grafik 29: Kaplan-Meier-Kurve OS β -Catenin membranös

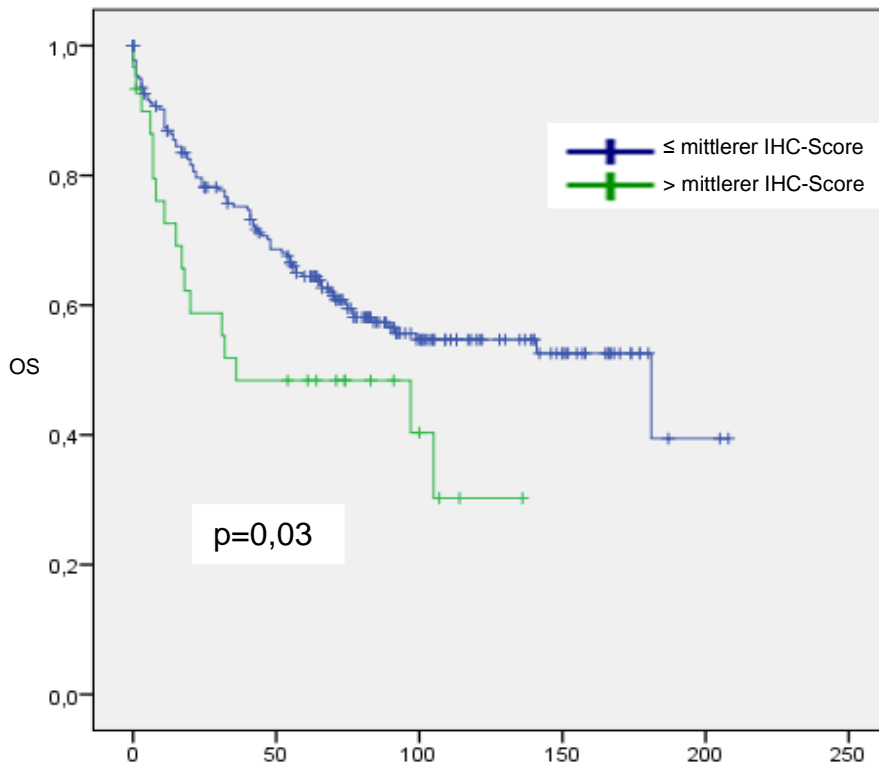


Zeit in Monaten Grafik 30: Kaplan-Meier-Kurve CSS β-Catenin membranös

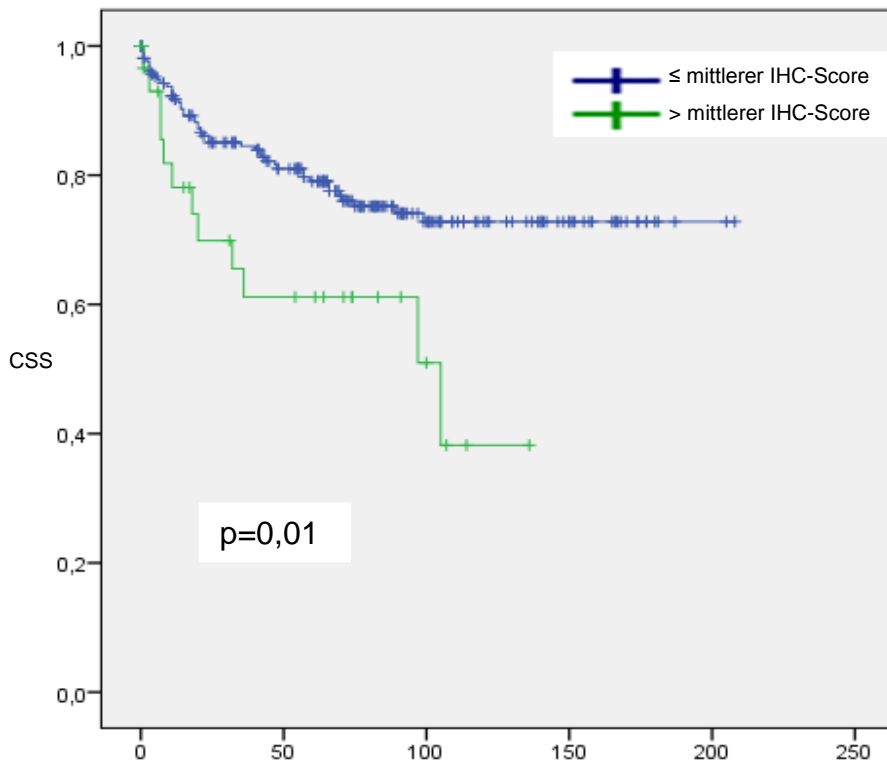
Dagegen ergaben sich für Patienten mit niedriger zytoplasmatischer β-Catenin-Expression sowohl hinsichtlich des OS als auch des CSS signifikant verlängerte Überlebensdaten:

| | β-Catenin zytoplasmatisch ≤37,5% | β-Catenin zytoplasmatisch >37,5% | p-Wert |
|----------------------------|--|--|--------|
| Medianes OS in Monaten | 124,9 (111,4-181,0) | 66,9 (45,7-88,1) | 0,03 |
| Medianes CSS in Monaten | 160,9 (149,2-172,7) | 81,1 (58,8-103,5) | 0,01 |

Tabelle 13: Korrelationen β-Catenin zytoplasmatisch OS und CSS



Zeit in Monaten Grafik 31: Kaplan-Meier-Kurve OS β -Catenin zytoplasmatisch



Zeit in Monaten Grafik 32: Kaplan-Meier-Kurve CCS β -Catenin zytoplasmatisch

3.4.2 Einfluss von Wnt1 und β -Catenin auf prognostische Überlebensdaten

Im Cox-Regressionsmodell zeigten sich signifikante Relationen sowohl zwischen krebsabhängigen (CSS) als auch zwischen nichtkrebsabhängigen (OS) Todesfällen und allgemeinen klinisch-pathologischen Variablen: Im Falle von fortgeschrittenen Stadien, positivem Nachweis von Lymphknoten- oder Fernmetastasen, höheren Fuhrman-Grades, Tumornekrose, sarkomatoider Entdifferenzierung sowie bei nachgewiesener Tumorinvasion in Gefäße oder in den Sinus renalis war das Risiko eines krebsabhängigen aber auch eines krebsunabhängigen Versterbens bei den jeweiligen Patienten erhöht ($p \leq 0,002$). Bei Patienten mit Tumorinfiltration ins perirenale Fettgewebe ($p=0,008$) und bei über das arithmetische Mittel (64 Jahre) fortgeschrittenem Lebensalter ($p=0,007$) ergab sich eine jeweils signifikant verkürzte Lebenserwartung (OS). Bezüglich der Immunhistochemie ließen sich im univariaten Cox-Regressionsmodell nur für erhöhte zytoplasmatische β -Catenin-Expressionen signifikante Korrelationen zu erhöhten Risiken krebsabhängiger (CSS; $p=0,012$) bzw. -unabhängiger (OS; $p=0,035$) Todesfälle nachweisen.

| Variable | Kategorie | Hazard Ratio (95% CI) | | | |
|---------------|------------------------|-----------------------|---------|----------------------|---------|
| | | OS | p-Wert | CSS | p-Wert |
| Alter | > / < Median | 1,69 (1,15-2,48) | 0,007 | 1,00 (0,62-1,64) | 0,97 |
| Geschlecht | Männlich / Weiblich | 0,90 (0,59-1,26) | 0,60 | 0,58 (0,31-1,07) | 0,08 |
| T-Stadium | T1 / T3 | 4,32 (2,93-6,37) | <0,0001 | 9,62 (5,20-17,77) | <0,0001 |
| N-Stadium | N0 / N1+2 | 3,22 (1,68-6,19) | <0,0001 | 5,01 (2,50-10,20) | <0,0001 |
| M-Stadium | M0 / M1 | 5,51 (3,59-8,47) | <0,0001 | 9,57 (5,65-16,19) | <0,0001 |
| Fuhrman-Grade | G1+2 / G3+4 | 3,80 (2,52-5,72) | <0,0001 | 6,78 (4,13-11,13) | <0,0001 |

Ergebnisse

| | | | | | |
|--|-----------------|---------------------|---------|----------------------|---------|
| Tumornekrose | ja / nein | 1,80 (1,24-2,60) | 0,002 | 2,81 (1,70-4,66) | <0,0001 |
| Sarkomatoide Entdifferenzierung | ja / nein | 4,60 (2,72-7,76) | <0,0001 | 7,36 (4,08-13,25) | <0,0001 |
| Gefäßinvasion | ja / nein | 3,10 (2,13-4,50) | <0,0001 | 5,67 (3,39-9,50) | <0,0001 |
| Perirenale und -pelvine Fettgewebsinvasion | ja / nein | 2,53 (1,23-4,11) | 0,008 | 2,20 (1,00-4,84) | 0,50 |
| Invasion ins perihiläre Fettgewebe | ja / nein | 2,29 (1,46-3,58) | <0,0001 | 2,78 (1,59-4,85) | <0,0001 |
| Wnt1-Score | > / < Median | 1,18 (0,81-1,73) | 0,40 | 0,95 (0,57-1,58) | 0,84 |
| β-Catenin-Score membranös | > / < Median | 1,26 (0,84-1,89) | 0,27 | 1,35 (0,79-2,30) | 0,28 |
| β-Catenin-Score zytoplasmatisch | > / < Median | 1,75 (1,04-2,94) | 0,035 | 2,26 (1,20-4,27) | 0,012 |

Tabelle 14: Univariate Cox-Regressionsanalyse

In der multivariaten Analyse bestätigte sich die erhöhte zytoplasmatische β-Catenin-Expression nicht als unabhängige Vorhersagevariable für CSS und OS, fortgeschrittenes Lebensalter bestätigte sich nur als Prädiktor hinsichtlich eines verkürzten OS (Hazard Ratio (HR): 1,88; p=0,002). Dagegen waren fortgeschrittenes Tumorstadium (CSS HR: 4,30; p<0,0001; OS HR 2,63; p<0,0001) und der Nachweis von Fernmetastasen (CSS HR: 4,58; p<0,0001; OS HR 3,43; p<0,0001) auch in der multivariaten Analyse signifikante unabhängige Vorhersagevariablen für CSS und OS.

Ergebnisse

| Variable | Kategorie | Hazard Ratio (95% CI) | | | |
|---|-----------------|-----------------------|---------|---------------------|---------|
| | | OS | p-Wert | CSS | p-Wert |
| Alter | > / < Median | 1,88 (1,25-2,83) | 0,002 | 1,18 (0,69-2,00) | 0,56 |
| T-Stadium | T1 / T3 | 2,63 (1,63-4,23) | <0,0001 | 4,30 (2,03-9,10) | <0,0001 |
| N-Stadium | N0 / N1+2 | 1,59 (0,75-3,42) | 0,23 | 1,89 (0,83-4,32) | 0,13 |
| M-Stadium | M0 / M1 | 3,43 (2,09-5,62) | <0,0001 | 4,58 (2,46-8,52) | <0,0001 |
| Fuhrman-Grade | G1+2 / G3+4 | 0,98 (0,54-1,80) | 0,96 | 1,37 (0,69-2,73) | 0,37 |
| Tumornekrose | ja / nein | 1,23 (0,83-1,84) | 0,30 | 1,65 (0,94-2,90) | 0,08 |
| Sarkomatoide Entdifferenzierung | ja / nein | 1,63 (0,83-3,20) | 0,15 | 1,62 (1,68-3,45) | 0,16 |
| β -Catenin-Score zytoplasmatisch | > / < Median | 1,00 (0,55-1,84) | 0,99 | 0,88 (0,43-1,83) | 0,75 |

Tabelle 15: Multivariate Cox-Regressionsanalyse

4. Diskussion

Neoplasien der Nieren sind in Deutschland bei Männern auf Rang sechs, bei Frauen auf Rang neun der häufigsten Auslöser krebsbedingter Todesfälle.³ Bis zu 90% der Nierentumore sind klarzellige Nierenzellkarzinome.⁵ Obwohl in den letzten Jahren eine ganze Reihe neuer zielgerichteter Substanzen die medikamentöse Therapie des klarzelligen Nierenzellkarzinoms stark verändert hat, ist die Prognose bei fortgeschrittener Tumorerkrankung weiterhin nicht zufriedenstellend. Dies macht die Erforschung neuer potentieller Ziele auf zellulärer Ebene und die Entwicklung entsprechender Therapeutika erforderlich. Ein Fokus liegt dabei auf dem kanonischen Wnt-/ β -Catenin-Signalweg, dessen Einfluss auf unterschiedliche, oft maligne Erkrankungen bis dato immer wieder neue Erkenntnisse bringt, gleichzeitig, wie bereits beschrieben, bei teils unübersichtlicher Datenlage aber auch kontroverse Diskussionen auslöst. Die Familie der Wnt-Proteine spielt beim embryonalen Zellwachstum, bei der Entwicklung von Zellpolarität und bei der Zelldifferenzierung eine wesentliche Rolle. Im adulten Organismus können über den Wnt-Signalweg der Zellzyklus und einige Zielgene reguliert werden, Fehler im Signalweg können zu einer Vielzahl von Erkrankungen führen, insbesondere Tumorerkrankungen werden durch Alterationen von Zellzyklus und Genexpression unterhalten.

β -Catenin ist eines der Haupteffektorproteine im kanonischen Wnt-Signalweg und spielt somit eine herausragende Rolle bei der Pathogenese Wnt-assoziiierter Erkrankungen, nicht zuletzt durch seinen Einfluss auf den Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition. Wnt1 war 1982 als erstes Protein seiner Art entdeckt worden, bislang sind direkt mit Wnt1 verknüpfte humane Krankheitsbilder nicht bekannt.¹¹²

Für einige Karzinome ist eindeutig eine Fehlregulation oder eine Mutation des Wnt-Signalweges oder einer seiner Komponenten nachgewiesen. Prominentestes Beispiel ist eine Keimbahnmutation im APC-Tumorsuppressorgen, das für das im Wnt-Signalweg am cytoplasmic destruction complex beteiligte APC-Protein codiert, welches eine Akkumulation

von β -Catenin verhindert. Die APC-Mutation verursacht die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP), ein autosomal-dominant vererbtes Tumorsyndrom, bei dem sich aus gehäuft auftretenden Dickdarmpolyphen bei verhältnismäßig jungen Patienten regelhaft Kolonkarzinome bilden. Mangels APC kann β -Catenin fehlreguliert im Zytosol akkumulieren und im Zellkern Teilungssignale aktivieren, was in eine beschleunigte Adenom-Karzinom-Sequenz mündet.¹⁴¹ Gleichzeitig besteht in diesem Fall eine verminderte membranöse Expression von β -Catenin, während sich bei nicht mutiertem APC ein starkes membranöses sowie schwache zytoplasmatische und nukleäre β -Catenin-Färbemuster nachweisen lassen.¹⁴²

Für zahlreiche Gene, die für Moleküle des Wnt-Signalweges codieren, sind Defekte und damit verbundene Erkrankungen bekannt:¹⁴³

| Defektes Gen | Assoziierte Erkrankung |
|--------------|---|
| APC | Familiäre Adenomatöse Polyposis |
| LRP5 | Osteoporose-Pseudogliom-Syndrom |
| LRP5 | Familiäre exsudative Vitreoretinopathie |
| LRP6 | Koronare Herzerkrankung |
| LRP6 | Spätmanifestation des Morbus Alzheimer |
| FZD4 | Familiäre exsudative Vitreoretinopathie |
| Norrin | Familiäre exsudative Vitreoretinopathie |
| WNT3 | Tetraamelie |
| WNT4 | Rückbildung des Müller-Gangs, Virilisierung |
| WNT4 | SERKAL-Syndrom |
| WNT5B | Diabetes Mellitus Typ 2 |
| WNT7A | Fuhrmann-Syndrom |
| WNT10A | Odonto-onycho-dermale Dysplasie |
| WNT10B | Übergewicht |
| WNT10B | Ektrodaktylie |
| AXIN1 | Hepatozelluläres Karzinom ¹⁴⁴ |
| TCF4 | Diabetes Mellitus Typ 2 |
| AXIN2 | Agnesie der Zähne |

Tabelle 16: Erkrankungen mit Assoziation zum Wnt-Signalweg, modifiziert nach Nusse 2012¹¹²

Defekte des für β -Catenin codierenden Gens CTNNB1 sind für einige, größtenteils maligne Erkrankungen verantwortlich. Unter anderen wurden für kolorektale Karzinome, anaplastische Schilddrüsenkarzinome, Medulloblastome, Ovarialkarzinome und Pleuramesotheliome sowie für die benignen Speicheldrüsenadenome und Pilomatrixome CTNNB1-Mutationen nachgewiesen. Zusätzlich werden Hepatoblastome, hepatozelluläre Karzinome und Prostatakarzinome mit CTNNB1-aktivierenden Mutationen in Verbindung gebracht.¹⁴⁵

Nach den onkologischen Erfolgen mit Small Molecules und zielgerichteten Therapeutika wird nun an Substanzen geforscht, die die einzelnen Bestandteile des Wnt-Signalwegs modifizieren und so den Krankheitsverlauf beeinflussen sollen. Bislang gestaltet sich die Suche nach geeigneten Molekülen schwierig und ist von den ersten klinischen Tests noch weit entfernt: Der im Zellkern gelegene Komplex aus β -Catenin und TCF ist zu flüchtig, GSK3 und CK1 γ haben zu vielfältige Funktionen und die Polaritäten von Zellen, Rezeptoren und intrazellulären Signalmolekülen bereiten Probleme, ein geeignetes Molekül in die Nähe seines Zieles zu bringen. Außerdem sind Teile des Wnt-Signalweges noch nicht ausreichend und widerspruchlos erforscht. Die besten Aussichten hat aktuell der Porc-Inhibitor IWP.¹⁴⁶ Porc vermittelt die Azetylierung von Wnt, noch bevor es die Zelle verlässt. Ohne die angehängten Lipide verbleibt Wnt intrazellulär und kann seine Funktionen nicht ausüben.^{114,129}

| Molekül | Ziel | Funktion | Effekt auf den Wnt-Signalweg | Studie |
|------------|-----------------------|----------------|------------------------------|--------------------------|
| IWP | Porc | Inhibitor | Inhibition | Lu et al., 2009 |
| XAV939 | Tankyrase/Axin | Axin-Aktivator | Inhibition | Huang et al., 2009 |
| IWR | Axin | Axin-Aktivator | Inhibition | Lu et al., 2009 |
| Pyvinium | CK1 | Inhibitor | Inhibition | Thorne et al., 2010 |
| SB-216763 | GSK3 | Inhibitor | Aktivierung | Coghlan et al. 2000 |
| BIO | GSK3 | Inhibitor | Aktivierung | Sato et al, 2004 |
| ICG-001 | CREB-binding protein | Inhibitor | Inhibition | Emami et al., 2004 |
| PKF115-584 | TCF/ β -Catenin | Inhibitor | Inhibition | Lepourcelet et al., 2004 |

Tabelle 17: Zielgerichtete Therapeutika am Wnt-Signalweg nach Clevers et al., 2012¹¹⁴

Als weiterer Therapieansatz wird die Entwicklung bzw. Anwendung von siRNAs (small interfering RNAs) diskutiert, welche direkte Wirkung auf die epigenetische Steuerung der β -Catenin-Expression hätten.

Überdies wurden für einige bekannte Medikamente unspezifische Effekte auf potentiell durch Alterationen des Wnt-Signalwegs ausgelöste Erkrankungen nachgewiesen: Protektive Wirkung haben demnach NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) wie Aspirin oder Indomethacin; außerdem sollen Retinoide, Flavonoide und Valproinsäure den Wnt-Signalweg beeinflussen.¹⁴⁷

Alle bisher identifizierten Wnt-Proteine aktivieren leicht modifiziert die Wnt-Signalkaskade, für deren einzelne Komponenten bezüglich des Nierenzellkarzinoms einige Alterationen bekannt sind: Zunächst bindet freies extrazelluläres Wnt an die membranständigen Fz- und Lrp5/6-Rezeptoren. Fz5 und Fz8 sind beim Nierenzellkarzinom höher exprimiert als in Normalgewebe¹¹⁹, an Fz10 gebundenes HIG2 induziert Zellproliferation¹²⁰. An Lrp5/6 binden die Wnt-Inhibitoren der DKK-Familie, hochregulierte Gene für DKK1¹⁴⁸, DKK2¹⁴⁹ und DKK3¹⁵⁰ können im Nierenzellkarzinom Apoptose auslösen; eine Überexpression von WIF-1, welcher freie Wnt-Moleküle bindet, löst ebenso Apoptose in Nierenzellkarzinomen aus. Andererseits wurde von Kawakami et al.¹⁵¹ für das Nierenzellkarzinom eine signifikante WIF-1-Downregulation nachgewiesen. Auch sFRPs vermögen freie Wnt-Moleküle zu binden, in der Literatur finden sich jedoch sowohl Anhaltspunkte für eine Tumorsuppressor- als auch für eine Tumorpromotorfunktion der sFRPs.¹²⁹ IGFBP-4 interagiert mit dem Wnt-Signalweg durch Bindung an Fz8 und Lrp6¹⁵² und ist bei metastasierten Nierenzellkarzinomen überexprimiert¹²⁷. Die geschilderten Informationen wurden vorrangig durch Chromatin-Immunopräzipitation, Genomexpressions-Analysen und über die Bestimmung von mRNA-Levels gewonnen.

Hsu et al.¹³⁰ untersuchten 2012 ein Kollektiv von 284 Patienten mit Nierenzellkarzinom, unter anderem im Hinblick auf die immunhistochemische Expression von Wnt10a im Tissue Micro Array. Für malignes Gewebe konnte eine im Vergleich zu Normalgewebe stark erhöhte zytoplasmatische Expression von Wnt10a nachgewiesen werden, was in der Studie als unabhängiger

Risikofaktor mit der Entwicklung des Nierenzellkarzinoms und schlechteren Langzeitüberlebenschancen einhergeht. Korrelationsanalysen für einzelne klinisch-histologische Parameter wie etwa TNM-Stadium oder gefäßinfiltrierendes Tumorwachstum wurden von Hsu et al. nicht durchgeführt. Eine Beteiligung der Wnt-Proteine und der unmittelbar mit diesen interagierenden Rezeptoren, Liganden und Effektoren an der Entstehung, dem weiteren Wachstum und der Metastasierung des Nierenzellkarzinoms, aber auch am potentiellen programmierten Zelltod von Zellen eines Nierentumors ist aufgrund der geschilderten Zusammenhänge offensichtlich.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit an 278 Tumorproben inklusive korrespondierendem Normalgewebe durchgeführten immunhistochemischen Analyse zu den Färbereigenschaften eines Wnt1-Antikörpers an klarzelligen Nierentumoren lassen zunächst keine eindeutigen Schlüsse auf die Kanzerogenese zu, die Signifikanz der Ergebnisse demonstriert dennoch den Einfluss von Wnt1 auf die Entwicklung des Nierenzellkarzinoms: Verglichen mit Normalgewebe ($52,2 \pm 22,6\%$) lässt sich im Tumorgewebe ($31,0 \pm 23,5\%$) eine signifikant schwächere Wnt1-Färbeintensität nachweisen ($p < 0,0001$).

Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Hsu et al., die in der Immunhistochemie für Wnt10a signifikant stärkere Expressionen in Malignomgewebe als in Normalgewebe nachweisen konnten. Gleichzeitig ist bekannt, dass Alterationen der unterschiedlichen Wnt-Moleküle sehr heterogene Krankheitsbilder auslösen (siehe Tabelle 16) und der Vergleich von Wnt1 mit Wnt10a daher nur bedingt möglich ist. Möglicherweise sind die Färbereigenschaften des Wnt1-Antikörpers auch durch eine Wnt1-Bindung an Fz- und Lrp5/6-Rezeptoren oder Wnt-inhibierende Faktoren wie WIF-1 und sFRPs beeinflusst; ebenso kann die erniedrigte Wnt1-Expression im Tumorgewebe durch Bindung von mehr freien Wnt1-Molekülen an durch epigenetische Regulation vermehrt vorhandene Fz-Rezeptoren, was wiederum mit Tumorprogress in Verbindung steht, erklärt werden.

Signifikante Korrelationen zwischen Tumoren mit erhöhter ($>40\%$) Wnt1-Expression und größeren Tumordurchmessern ($p=0,01$), fortgeschrittenem Tumorstadium ($p=0,004$) sowie erhöhtem Risiko für gefäßinfiltrierendes

Tumorwachstum ($p=0,02$) bestätigen den Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die Biologie des klarzelligen Nierenzellkarzinoms, was sowohl Tumorentstehung als auch weiteres Wachstum betrifft. Obwohl aufgrund dieser Korrelationen eine Verknüpfung von erhöhter Wnt1-Expression mit schlechteren Langzeitergebnissen zu erwarten wäre, ließ sich für Wnt1 weder im uni- noch im multivariaten Cox-Regressionsmodell ein signifikanter Einfluss auf Langzeitüberlebensdaten (OS, CSS) nachweisen.

Diesbezüglich arbeiteten Hsu et al. für Patienten mit erhöhter Wnt10a-Expression Korrelationen zu schlechteren Langzeitergebnissen heraus: Sowohl die univariate ($p<0,001$) als auch die multivariate ($p=0,017$) Regressionsanalyse ergab ein erhöhtes Risiko für kürzeres OS, auch bei den Daten für krankheitsfreies Überleben (DFS, Disease-free Survival) zeigten sich uni- ($p<0,001$) wie multivariat ($p=0,009$) signifikant erhöhte Risiken für Rezidive bei erhöhter Wnt10a-Expression.

Das Potential des Wnt-Signalwegs als Therapie-Ziel sowie der Stellenwert bisher postulierter Alterationen des Signalwegs im Nierenzellkarzinom werden durch unsere Ergebnisse untermauert, wenngleich nicht alle Ergebnisse mit den bislang publizierten Daten im Detail übereinstimmen.

Im weiteren Ablauf des Wnt-Signalweges ist β -Catenin das intrazelluläre Schlüsselprotein der Kaskade. Ohne rezeptorgebundenen Wnt verhindert der cytoplasmic destruction complex aus β -Catenin, Axin, GSK3, CK1 γ und APC die zytosolische β -Catenin-Akkumulation und sorgt für den β TrCP-vermittelten β -Catenin-Abbau im Proteasom. Wenn hingegen Wnt an Fz und Lrp5/6 bindet, wird Lrp5/6 durch GSK3 und CK1 γ phosphoryliert und Axin bindet an den Phosphorrest. Dadurch zerfällt der cytoplasmic destruction complex und β -Catenin akkumuliert im Zytoplasma. Konsekutiv verdrängt β -Catenin im Zellkern Groucho/TLF und bindet an TCF und Lef, was schließlich zur vermehrten Transkription der β -Catenin-Zielgene führt. Gleichzeitig besteht eine enge Verknüpfung zwischen membranösem und zytoplasmatischem β -Catenin sowie der EMT bzw. dem Verlust von E-Cadherin und dadurch zu invasivem Tumorwachstum.

Bezogen auf das Nierenzellkarzinom sind einige Alterationen des intrazellulären, β -Catenin-abhängigen Teils des Wnt-Signalweges beschrieben. Der Abbau von β -Catenin im Proteasom ist unter anderem von E3-Ubiquitin-Ligasen abhängig, welche einer Steuerung durch das VHL-Gen unterliegen; dieses wiederum ist in 50% der klarzelligen Nierenzellkarzinome mutiert, was zu gestörtem β -Catenin-Abbau führt. Auch die VHL-Zielgene HIF-1 α und HIF-2 α wirken auf β -Catenin: HIF-1 α spaltet den nukleären β -Catenin-TCF-Komplex und senkt die Transkriptionsaktivität, HIF-2 α steigert diese durch Bindung an den β -Catenin-TCF-Komplex.¹²³⁻¹²⁵

Idax ist ein Protein, das durch Bindung an Dishevelled den Wnt-Signalweg inhibiert. Für das fortgeschrittene Nierenzellkarzinom konnte eine homozygote Deletion des für Idax codierenden Genes CXXC4 nachgewiesen werden.¹²⁶ In diesem Zusammenhang ist außerdem bemerkenswert, dass sowohl das VHL-Gen als auch das β -Catenin-Gen auf Chromosom 3 lokalisiert ist. Maestro et al.¹⁵³ wiesen in über 40% der Nierenzellkarzinome einen „loss of heterozygosity“ am kurzen Arm des Chromosoms 3 nach, was dafür spricht, dass neben dem VHL-Gen weitere auf Chromosom 3 lokalisierte Gene an der Entwicklung eines Nierenzellkarzinoms beteiligt sein könnten.

Auch diese Studienergebnisse untermauern den Einfluss des β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalwegs auf das Nierenzellkarzinom. Zudem liegen einige immunhistochemische Studien vor, die die Färbereigenschaften eines β -Catenin-Antikörpers im Nierenzellkarzinom bezogen auf Färbemuster und klinische Parameter analysieren:

Kim et al.¹³¹ untersuchten im Jahr 2000 unter anderem mittels Immunhistochemie in 52 Nierenzellkarzinom-Präparaten (davon 22 ccRCC) Alterationen der β -Catenin-Expression. In fünf der klarzelligen Karzinome (22,7%) fand sich eine zytoplasmatische Färbung, während papilläre und chromophobe Tumoren keine Färbung des Zytoplasmas aufwiesen. Membranöse Färbemuster ließen sich ohne erkennbares Muster in mehreren Präparaten aller Karzinom-Subtypen nachweisen, eine Färbung des Zellkerns fand sich in keinem Präparat. Korrelationen zu klinischen Daten wurden nicht untersucht.

Bilim et al.¹³² analysierten immunhistochemische β -Catenin-Färbemuster in 77 primären und zwölf metastasierten Nierenzellkarzinomen. Auf die Tumorsubtypen wurde in der Studie nicht eingegangen. In 15,5% der Präparate konnte eine relativ zu den restlichen Tumoren reduzierte membranöse β -Catenin-Färbung und damit korrelierend fortgeschrittene Stadien ($p < 0,05$) sowie nodale Tumorinvasion ($p < 0,05$) beobachtet werden. Färbemuster, die für eine zytoplasmatische oder nukleäre β -Catenin-Überexpression sprechen, fanden sich ebenso wenig wie Verknüpfungen der β -Catenin-Färbung zu Rezidiv- oder Langzeitüberlebensdaten.

2004 wiesen auch Aaltomaa et al.¹³³ einen Zusammenhang zwischen reduzierter membranöser β -Catenin-Färbung und klinischen Daten nach: Signifikante Korrelationen zeigten sich bezogen auf venöse (intratumoral: $p = 0,02$; extratumoral $p = 0,029$) und perineurale ($p < 0,001$) Tumorausbreitung sowie kurzes rückfallfreies Überleben ($p = 0,006$). Untersucht wurden 124 (davon 101 klarzellige) Nierenzellkarzinome, membranöse und zytoplasmatische Färbungen fanden sich in unterschiedlichen Ausmaßen in allen Präparaten, eine nukleäre Färbung einiger weniger Zellkerne konnte in 17 Fällen (14%) nachgewiesen werden. Signifikante Korrelationen zwischen zytoplasmatischen oder nukleären Färbemustern und klinischen Daten wurden nicht gefunden.

In einer Studie an 34 jungen Patienten mit Nierentumoren wiesen Bruder et al.¹³⁴ im Normalgewebe eine stärkere membranöse β -Catenin-Färbung in Sammelrohren und Henle'scher Schleife sowie eine auffällige zytoplasmatische Färbung im Bereich der proximalen und distalen Tubuli nach. Eine dominante β -Catenin-Färbung im Zellkern ließ sich weder in benignem noch malignem Gewebe nachweisen, fünf Präparate zeigten eine schwache fokale nukleäre Färbung. Von den drei in der Studie berücksichtigten klarzelligen Nierenzellkarzinomen zeigten zwei eine starke membranöse Färbung, zytoplasmatisch wurden uneinheitliche Färbemuster nachgewiesen. Klinische Daten wurden nicht mit den Ergebnissen der Immunhistochemie korreliert.

Die Arbeitsgruppe um Ronkainen¹³⁵ führte immunhistochemische β -Catenin-Färbungen an 152 Nephrektomiepräparaten durch, worunter sich 128 klarzellige Karzinome befanden. 44% aller Präparate zeigten eine Färbung des

Zellkerns, welche mit niedrigem Fuhrman-Grade ($p=0,005$), nicht jedoch mit Tumorstadium oder Langzeitüberlebensdaten korrelierte. In 9% der Proben wurde eine zytoplasmatische β -Catenin-Färbung beobachtet, signifikante Verbindungen zu klinischen Daten ließen sich nicht herstellen. Membranöse Färbemuster wurden in der Studie nicht berücksichtigt.

Lian et al.¹³⁶ analysierten 2012 β -Catenin-Färbungen an 60 Nierenzellkarzinomen (48 ccRCC). Klarzellige Tumore zeigten eine signifikant stärkere zytoplasmatische β -Catenin-Expression als Normalgewebe ($p<0,001$), was bezogen auf alle untersuchten Tumore mit dem histologischen Grade nach Fuhrman ($p=0,016$), dem Tumorstadium ($p=0,039$) und kürzerem Langzeitüberleben ($p=0,045$) korrelierte. Membranöse oder nukleäre Färbemuster wurden nicht separat ausgewertet.

Ebenfalls 2012 wurden von Hsu et al. 284 Proben von Nierenzellkarzinomgewebe immunhistochemisch mit einem β -Catenin-Antikörper gefärbt. Hierbei konnte eine verstärkte β -Catenin-Färbung von Zytoplasma und Zellkernen demonstriert werden, während sich im Normalgewebe eine stärkere Färbung der Zellmembranen und nur eine schwache zytoplasmatische β -Catenin-Färbung zeigte. Außerdem konnte die nukleäre β -Catenin-Färbung als unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung eines Nierenzellkarzinoms, für kürzeres OS (univariat $p<0,001$, multivariat $p=0,03$) und für kürzeres krankheitsfreies Überleben (DFS; univariat $p<0,001$, multivariat $p=0,017$) identifiziert werden. In der univariaten Analyse wurde auch für erhöhtes zytoplasmatisches β -Catenin ein kürzeres OS ($p=0,001$) und DFS ($p=0,001$) nachgewiesen, was sich multivariat aber nicht als signifikantes Ergebnis bestätigte. Für die erhöhte bzw. die erniedrigte membranöse β -Catenin-Färbung fanden sich keine signifikanten Korrelationen zu Langzeitüberlebensdaten.

Die Ergebnisse der eigenen immunhistochemischen β -Catenin-Färbungen stehen zum Teil im Einklang mit vorbeschriebenen Studienresultaten. Zunächst fällt auf, dass die β -Catenin-Expression ebenso wie die Wnt-1-Expression verglichen mit Normalgewebe im Tumorgewebe reduziert ist, allerdings nicht signifikant. Dies gilt für die membranöse ($p=0,47$) wie die zytoplasmatische

($p=0,25$) β -Catenin-Expression, bezogen auf die membranöse Färbung findet sich eine Übereinstimmung mit Bilim et al., hinsichtlich der zytoplasmatischen Färbung stehen unsere Ergebnisse im Widerspruch zu den Resultaten von Lian und Hsu et al.

Die in den eigenen Untersuchungen beobachteten Korrelationen von membranöser β -Catenin-Überexpression ($>69,0\%$ des Maximalscores) mit höherem Tumorstadium ($p=0,03$), gefäßinfiltrierendem Tumorwachstum ($p=0,01$) und dem Auftreten von Tumornekrose ($p=0,04$) bzw. von zytoplasmatischer β -Catenin-Überexpression ($>37,5\%$ des Maximalscores) mit größeren Tumoren ($p=0,01$), Tumorstadium ($p=0,003$), Infiltration von Lymphknoten ($p=0,04$), Grade nach Fuhrman ($p\leq 0,001$), gefäßinfiltrierendem Tumorwachstum ($p=0,002$) sowie sarkomatoider Entdifferenzierung der Tumorzellen ($p=0,01$) widersprechen den Ergebnissen von Kim und Aaltomaa, die Korrelationen zu klinischen Daten für die reduzierten β -Catenin-Expressionen herstellten. Lian et al. hingegen fanden ebenfalls signifikante Assoziationen zwischen β -Catenin-Überexpression und klinischen Parametern. Die in unseren Untersuchungen herausgearbeiteten Korrelationen für erhöhte membranöse β -Catenin-Expression widersprechen sowohl den Analysen von Kim und Aaltomaa als auch der etwa für das Kolon-Karzinom gängigen Theorie, wonach membranöses β -Catenin nur in Normalgewebe erhöht ist und in Tumorgewebe in der Regel zu Gunsten erhöhter zytoplasmatischer und nukleärer Expression erniedrigt ist. Dies kann dadurch bedingt sein, dass die korrelierenden Parameter (höheres Tumorstadium, gefäßinfiltrierendes Tumorwachstum, Auftreten von Tumornekrose) für weit fortgeschrittene Tumoren charakteristisch sind und die Konfiguration des membranösen β -Catenins in diesem Fall von anderen Faktoren bestimmt wird. Gleichzeitig weichen auch Magen- und invasiv duktales Mamma-Karzinome von der gängigen Theorie ab.¹⁵⁴

Bezogen auf die Langzeitüberlebensdaten wiesen wir in der univariaten, allerdings nicht in der multivariaten Cox-Regressions-Analyse eine Korrelation zwischen erhöhter zytoplasmatischer β -Catenin-Expression ($>37,5\%$ des Maximalscores) und kürzerem CSS ($p=0,01$) sowie OS ($p=0,03$) nach.

Tendenziell entspricht dies den Ergebnissen von Lian et al., die für zytoplasmatische β -Catenin-Überexpression ein kürzeres Langzeitüberleben ($p=0,045$) ermittelten. Auch Hsu et al. wiesen univariat signifikante Korrelationen von erhöhter zytoplasmatischer β -Catenin-Expression zu kürzerem OS und DFS nach.

Für die membranöse β -Catenin-Expression fanden sich keine Relationen zu Langzeitüberlebensdaten, was auch bei den anderen Studien zur immunhistochemischen β -Catenin-Expression im Nierenzellkarzinom der Fall war.

Eine fokale β -Catenin-Färbung des Zellkernes wiesen wir in 6,5% der Präparate nach, was sich am ehesten mit den Ergebnissen von Bruder et al. deckt und im Widerspruch zu den Resultaten von Hsu et al. steht. Diese führten zudem noch Färbungen für c-myc und Cyclin D1 durch und fanden für jeweils erhöhte Expressionen teils signifikante Korrelationen zu kürzerem OS und DFS. Unsere Resultate lassen keine weiteren Schlüsse auf Prozesse im Zellkern zu und stehen in Kontrast zu Untersuchungen an anderen Karzinomen mit nachgewiesener nukleärer β -Catenin-Akkumulation und resultierender EMT. Andererseits sind in der Literatur auch alternative Phosphorylierungszustände von β -Catenin beschrieben (s.o.), die mit erhöhter nukleärer Phospho- β -Catenin-Expression und daraus resultierender vermehrter Transkription der Wnt-Zielgene in Verbindung stehen. Möglicherweise wäre eine zusätzliche immunhistochemische Färbung mit einem Phospho- β -Catenin-Antikörper diesbezüglich aufschlussreich gewesen.

Mit 278 Patienten stellt diese Studie zu Wnt und β -Catenin bislang eine der größten ihrer Art dar und leistet einen Beitrag zur weiteren Erforschung des Wnt-Signalweges. Unsere Ergebnisse unterstreichen die Annahme, dass der Wnt-Signalweg Einfluss auf die Entstehung und das weitere Wachstum von klarzelligen Nierenzellkarzinomen hat. Dies wird vor allem durch die herausgearbeiteten Korrelationen zwischen Patientendaten bzw. Tumorcharakteristika und den Analysen der Immunhistochemie deutlich. Gleichzeitig zeigt unsere Studie aber auch die Komplexität des Wnt-

Signalweges auf und weist auf einige nicht näher verstandene Details hin, besonders was die verschiedenen Lokalisationen und Wirkungen von β -Catenin sowie die Rolle der EMT im Nierenzellkarzinom betrifft. Die nachgewiesene Verknüpfung hoher zytoplasmatischer β -Catenin-Expression mit kürzerem medianen CSS und OS spricht eindeutig für einen aktivierten Wnt-Weg bzw. eine relevante zytoplasmatische β -Catenin-Akkumulation beim Nierenzellkarzinom, jedoch ist nicht exakt nachvollziehbar, wie sich β -Catenin zwischen Membran, Zytoplasma und Zellkern mit welchen Effekten bewegt. Die von anderen Karzinomentitäten wie etwa dem Kolon-Karzinom bekannte und immunhistochemisch nachvollziehbare Verlagerung von β -Catenin aus den Zellmembranen ins Zytoplasma und die β -Catenin-Akkumulation im Zellkern konnte für das Nierenzellkarzinom in dieser Form nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend stellt der Wnt-/ β -Catenin-Signalweg im Nierenzellkarzinom eindeutig ein potentielles künftiges Therapieziel dar, wenngleich ein tieferes und detaillierteres Verständnis des Signalwegs zur Entwicklung zielgerichteter Therapeutika nötig ist.

5. Zusammenfassung

Für einige Bestandteile der Wnt-/ β -Catenin-Signalkaskade wurden jüngst Zusammenhänge zur Entwicklung und zum Fortschreiten von Nierenzellkarzinomen nachgewiesen. Für Wnt1, einem der Schlüsselliganden im Signalweg, liegen bezüglich des Nierenzellkarzinoms bislang allerdings kaum Daten vor. Daher wurde in dieser Studie der Einfluss von Alterationen der von Wnt1 ausgehenden Achse des Signalwegs auf das Haupteffektorprotein β -Catenin untersucht, ein besonderes Augenmerk war auf Zusammenhänge mit klinisch-pathologischen Daten sowie Langzeitüberlebensdaten gerichtet.

In Tissue-Micro-Array-Technik wurden korrespondierende Areale von Tumor- und Normalgewebe von 278 Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom immunhistochemisch jeweils mit einem Wnt1- und einem β -Catenin-Antikörper gefärbt und anschließend die Expressionsmuster ausgewertet. Aus Färbeintensität und prozentualem Anteil der gefärbten Zellen wurden Scores errechnet und zwischen Karzinom- und Normalgewebe verglichen. Basierend auf dem jeweiligen Median des Maximalscores von Wnt1, membranöser und zytoplasmatischer β -Catenin-Expression wurden die Scores kategorisiert und mit klinischen und pathologischen Daten korreliert. Die Überlebensdaten wurden mit Logrank-Test und Kaplan-Meier-Schätzung analysiert, in Cox-Regressionsanalysen wurden Wnt1 und β -Catenin als Prognosefaktoren untersucht.

Eine vermehrte Wnt1-Expression war mit größerem Tumordurchmesser, fortgeschrittenem Stadium und Gefäßinvasion assoziiert ($p < 0,02$), erhöhte membranöse β -Catenin-Expression mit fortgeschrittenem Stadium, Gefäßinvasion und Tumornekrosen ($p \leq 0,01$). Bei erhöhter zytoplasmatischer β -Catenin-Expression fanden sich Korrelationen zu größerem Tumordurchmesser, fortgeschrittenem Stadium, Lymphknoteninfiltration, höherem Fuhrman-Grade, Gefäßinvasion und sarkomatoider Entdifferenzierung ($p \leq 0,01$), sowie in der univariaten Cox-Regressionsanalyse signifikant verkürzte Überlebenszeiten für OS (HR 1,75; $p = 0,035$) und CSS (HR 2,26; $p = 0,012$).

Zusammengefasst waren aggressivere Tumoren mit im Vergleich zu Normalgewebe veränderten Wnt1- bzw. β -Catenin-Expressionen verknüpft, gleichzeitig fielen die Komplexität des Wnt-Signalweges und einige nicht näher verstandene Details auf, besonders was die verschiedenen Lokalisationen und Wirkungen von β -Catenin sowie die Rolle der EMT im Nierenzellkarzinom betrifft. Die von anderen Karzinomentitäten (z.B. Kolon-Karzinom) bekannte und immunhistochemisch nachvollziehbare Verlagerung von β -Catenin aus den Zellmembranen ins Zytoplasma und die Akkumulation im Zellkern konnte für das Nierenzellkarzinom in dieser Form nicht bestätigt werden. Dennoch sprechen unsere Ergebnisse eindeutig für einen aktivierten Wnt-Weg bzw. eine relevante zytoplasmatische β -Catenin-Akkumulation beim Nierenzellkarzinom, weshalb der Signalweg als potentiell zukünftiges Therapieziel zu sehen ist.

6. Literaturverzeichnis

1. Ljungberg B, Campbell SC, Cho HY, Jacqmin D, Lee JE, Weikert S and Kiemeny LA: The epidemiology of renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 60: 615-21, 2011.
2. Schmelz HU, Weidner W and Sparwasser C: *Facharztwissen Urologie: Differenzierte Diagnostik und Therapie.* Heidelberg, Springer Medizin, 2010, pp 197-222.
3. Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Bertz J, Haberland J, Kraywinkel K and Wolf U: *Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends.* Berlin, Robert-Koch-Institut. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., 2010.
4. Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Baras N, Barnes B, Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K et al.: *Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe.* Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012.
5. Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, Patard JJ, Mulders PF, Sinescu IC and Group EAoUG: *EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update.* *Eur Urol.* 58: 398-406, 2010.
6. Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Kurth B-M and Wolf U: *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland: Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes.* Berlin, Robert-Koch-Institut, 2010.
7. Levi F, Ferlay J, Galeone C, Lucchini F, Negri E, Boyle P and La Vecchia C: *The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe.* *BJU Int.* 101: 949-58, 2008.
8. Moore LE, Wilson RT and Campleman SL: *Lifestyle factors, exposures, genetic susceptibility, and renal cell cancer risk: a review.* *Cancer Invest.* 23: 240-55, 2005.
9. McLaughlin JK, Lindblad P, Mellempgaard A, McCredie M, Mandel JS, Schlehofer B, Pommer W and Adami HO: *International renal-cell cancer study. I. Tobacco use.* *Int J Cancer.* 60: 194-8, 1995.
10. Cho E, Curhan G, Hankinson SE, Kantoff P, Atkins MB, Stampfer M and Choueiri TK: *Prospective evaluation of analgesic use and risk of renal cell cancer.* *Arch Intern Med.* 171: 1487-93, 2011.
11. Maisonneuve P, Agodoa L, Gellert R, Stewart JH, Buccianti G, Lowenfels AB, Wolfe RA, Jones E, Disney AP, Briggs D et al.: *Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study.* *Lancet.* 354: 93-9, 1999.
12. Lin HF, Li YH, Wang CH, Chou CL, Kuo DJ and Fang TC: *Increased risk of cancer in chronic dialysis patients: a population-based cohort study in Taiwan.* *Nephrol Dial Transplant,* 2011.

13. Clague J, Lin J, Cassidy A, Matin S, Tannir NM, Tamboli P, Wood CG and Wu X: Family history and risk of renal cell carcinoma: results from a case-control study and systematic meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 18: 801-7, 2009.
14. Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W and Geil L: Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science.* 260: 1317-20, 1993.
15. Neumann HP, Lips CJ, Hsia YE and Zbar B: Von Hippel-Lindau syndrome. *Brain Pathol.* 5: 181-93, 1995.
16. Kim WY and Kaelin WG: Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol.* 22: 4991-5004, 2004.
17. Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG and Goldberg MA: Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 10595-9, 1996.
18. Kaelin WG: The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 13: 680s-684s, 2007.
19. Fischer J, Palmedo G, von Knobloch R, Bugert P, Prayer-Galetti T, Pagano F and Kovacs G: Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours. *Oncogene.* 17: 733-9, 1998.
20. Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, Barclay E, Jaeger EE, Kelsell D, Leigh I, Gorman P, Lamlum H, Rahman S et al.: Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet.* 30: 406-10, 2002.
21. Alam NA, Olpin S and Leigh IM: Fumarate hydratase mutations and predisposition to cutaneous leiomyomas, uterine leiomyomas and renal cancer. *Br J Dermatol.* 153: 11-7, 2005.
22. Schmidt LS, Nickerson ML, Warren MB, Glenn GM, Toro JR, Merino MJ, Turner ML, Choyke PL, Sharma N, Peterson J et al.: Germline BHD-mutation spectrum and phenotype analysis of a large cohort of families with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Am J Hum Genet.* 76: 1023-33, 2005.
23. Linehan WM, Pinto PA, Srinivasan R, Merino M, Choyke P, Choyke L, Coleman J, Toro J, Glenn G, Vocke C et al.: Identification of the genes for kidney cancer: opportunity for disease-specific targeted therapeutics. *Clin Cancer Res.* 13: 671s-679s, 2007.
24. Speicher MR, Schoell B, du Manoir S, Schröck E, Ried T, Cremer T, Störkel S, Kovacs A and Kovacs G: Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol.* 145: 356-64, 1994.
25. Störkel S, Eble JN, Adlakha K, Amin M, Blute ML, Bostwick DG, Darson M, Delahunt B and Iczkowski K: Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer.* 80: 987-9, 1997.
26. Treiber U: *Manual Urogenitale Tumoren. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge.* München, Tumorzentrum München, 2008.
27. Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N, Cindolo L, Ficarra V, Zisman A, De La Taille A, Tostain J, Artibani W, Abbou CC et al.: Prognostic value

- of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience. *J Clin Oncol.* 23: 2763-71, 2005.
28. Cohen HT and McGovern FJ: Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 353: 2477-90, 2005.
 29. Pignot G, Elie C, Conquy S, Vieillefond A, Flam T, Zerbib M, Debré B and Amsellem-Ouazana D: Survival analysis of 130 patients with papillary renal cell carcinoma: prognostic utility of type 1 and type 2 subclassification. *Urology.* 69: 230-5, 2007.
 30. Shen SS, Krishna B, Chirala R, Amato RJ and Truong LD: Kidney-specific cadherin, a specific marker for the distal portion of the nephron and related renal neoplasms. *Mod Pathol.* 18: 933-40, 2005.
 31. Molina AM, Tickoo SK, Ishill N, Trinos MJ, Schwartz LH, Patil S, Feldman DR, Reuter VE, Russo P and Motzer RJ: Sarcomatoid-variant Renal Cell Carcinoma: Treatment Outcome and Survival in Advanced Disease. *Am J Clin Oncol.* 34: 454-9, 2011.
 32. Bannowsky A, Leuschner I, Schiller H, Bothe K, Osmonov D, Jünemann KP and Hautmann S: [Sarcomatoid renal cell carcinoma. A rare and aggressive variation of primary renal cell carcinoma]. *Urologe A.* 46: 406-11, 2007.
 33. Cangiano T, Liao J, Naitoh J, Dorey F, Figlin R and Beldegrun A: Sarcomatoid renal cell carcinoma: biologic behavior, prognosis, and response to combined surgical resection and immunotherapy. *J Clin Oncol.* 17: 523-8, 1999.
 34. Russo P: Multi-modal treatment for metastatic renal cancer: the role of surgery. *World J Urol.* 28: 295-301, 2010.
 35. Gupta K, Miller JD, Li JZ, Russell MW and Charbonneau C: Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): a literature review. *Cancer Treat Rev.* 34: 193-205, 2008.
 36. Kruck S, Bedke J, Kuczyk MA and Merseburger AS: Second-line systemic therapy for the treatment of metastatic renal cell cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 12: 777-85, 2012.
 37. Bedke J, Buse S, Kurosch M, Haferkamp A, Jäger D and Hohenfellner M: [Paraneoplastic syndrome in renal cell carcinoma]. *Urologe A.* 46: 45-8, 2007.
 38. Bedke J, Chun FK, Merseburger A, Scharpf M, Kasprzyk K, Schilling D, Sievert KD, Stenzl A and Kruck S: Inflammatory prognostic markers in clear cell renal cell carcinoma - preoperative C-reactive protein does not improve predictive accuracy. *BJU Int.* 110: E771-7, 2012.
 39. Bedke J and Stenzl A: [Renal cell carcinoma: recent developments in diagnostics and therapy]. *Urologe A.* 49 Suppl 1: 178-84, 2010.
 40. Warren KS and McFarlane J: The Bosniak classification of renal cystic masses. *BJU Int.* 95: 939-42, 2005.
 41. Gakis G, Kramer U, Schilling D, Kruck S, Stenzl A and Schlemmer HP: Small renal Oncocytomas: Differentiation with multiphase CT. *Eur J Radiol.* 2010.
 42. Sun MR and Pedrosa I: Magnetic resonance imaging of renal masses. *Semin Ultrasound CT MR.* 30: 326-51, 2009.

43. Krestin GP, Gross-Fengels W and Marincek B: [The importance of magnetic resonance tomography in the diagnosis and staging of renal cell carcinoma]. *Radiologe*. 32: 121-6, 1992.
44. Park JW, Jo MK and Lee HM: Significance of 18F-fluorodeoxyglucose positron-emission tomography/computed tomography for the postoperative surveillance of advanced renal cell carcinoma. *BJU Int*. 103: 615-9, 2009.
45. Wu HC, Yen RF, Shen YY, Kao CH, Lin CC and Lee CC: Comparing whole body 18F-2-deoxyglucose positron emission tomography and technetium-99m methylene diphosphate bone scan to detect bone metastases in patients with renal cell carcinomas - a preliminary report. *J Cancer Res Clin Oncol*. 128: 503-6, 2002.
46. Sun MR, Ngo L, Genega EM, Atkins MB, Finn ME, Rofsky NM and Pedrosa I: Renal cell carcinoma: dynamic contrast-enhanced MR imaging for differentiation of tumor subtypes--correlation with pathologic findings. *Radiology*. 250: 793-802, 2009.
47. Shannon BA, Cohen RJ, de Bruto H and Davies RJ: The value of preoperative needle core biopsy for diagnosing benign lesions among small, incidentally detected renal masses. *J Urol*. 180: 1257-61; discussion 1261, 2008.
48. Ljungberg B, Cowan N, Hanbury D, Hora M, Kuczyk M, Merseburger A, Mulders P, Patard J and Sinescu I: Guidelines on Renal Cell Carcinoma. *Uroweb* 2010. Available at http://www.uroweb.org/gls/pdf/09_Renal_Cell_Carcinoma%202010.pdf. Accessed October 4, 2011., 2010.
49. Fuhrman SA, Lasky LC and Limas C: Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 6: 655-63, 1982.
50. Sobin L, Gospodariwicz M and Wittekind C: TNM classification of malignant tumors. UICC Union for International Cancer Control. 7th edn. Wiley-Blackwell, 2009: pp. 255-257.
51. Moch H, Gasser T, Amin MB, Torhorst J, Sauter G and Mihatsch MJ: Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma: a Swiss experience with 588 tumors. *Cancer*. 89: 604-14, 2000.
52. Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL and Blute ML: Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 27: 612-24, 2003.
53. Lang H and D J: Prognostic Factors in Renal Cell Carcinoma. *EAU Update Series*. 1: 215-219, 2003.
54. de Peralta-Venturina M, Moch H, Amin M, Tamboli P, Hailemariam S, Mihatsch M, Javidan J, Stricker H, Ro JY and Amin MB: Sarcomatoid differentiation in renal cell carcinoma: a study of 101 cases. *Am J Surg Pathol*. 25: 275-84, 2001.
55. Sengupta S, Lohse CM, Leibovich BC, Frank I, Thompson RH, Webster WS, Zincke H, Blute ML, Cheville JC and Kwon ED: Histologic coagulative tumor necrosis as a prognostic indicator of renal cell carcinoma aggressiveness. *Cancer*. 104: 511-20, 2005.

56. Volpe A and Patard JJ: Prognostic factors in renal cell carcinoma. *World J Urol.* 28: 319-27, 2010.
57. Flanigan RC, Polcari AJ and Hugen CM: Prognostic variables and nomograms for renal cell carcinoma. *Int J Urol.* 18: 20-31, 2011.
58. Kattan MW, Reuter V, Motzer RJ, Katz J and Russo P: A postoperative prognostic nomogram for renal cell carcinoma. *J Urol.* 166: 63-7, 2001.
59. Karakiewicz PI, Briganti A, Chun FK, Trinh QD, Perrotte P, Ficarra V, Cindolo L, De la Taille A, Tostain J, Mulders PF et al.: Multi-institutional validation of a new renal cancer-specific survival nomogram. *J Clin Oncol.* 25: 1316-22, 2007.
60. Zisman A, Pantuck AJ, Dorey F, Said JW, Shvarts O, Quintana D, Gitlitz BJ, deKernion JB, Figlin RA and Belldegrun AS: Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. *J Clin Oncol.* 19: 1649-57, 2001.
61. Frank I, Blute ML, Chevillat JC, Lohse CM, Weaver AL and Zincke H: An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score. *J Urol.* 168: 2395-400, 2002.
62. Ljungberg B: Kidney cancer: A new nomogram predicting survival in renal cell carcinoma. *Nat Rev Urol.* 7: 423-4, 2010.
63. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET and Carbone PP: Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 5: 649-55, 1982.
64. Négrier S, Escudier B, Gomez F, Douillard JY, Ravaud A, Chevreau C, Buclon M, Pérol D and Lasset C: Prognostic factors of survival and rapid progression in 782 patients with metastatic renal carcinomas treated by cytokines: a report from the Groupe Français d'Immunothérapie. *Ann Oncol.* 13: 1460-8, 2002.
65. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A and Ferrara J: Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 17: 2530-40, 1999.
66. Heng DY, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, Eigl BJ, Ruether JD, Cheng T, North S et al.: Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study. *J Clin Oncol.* 27: 5794-9, 2009.
67. Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P and Mazumdar M: Interferon- α as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 20: 289-96, 2002.
68. Motzer RJ, Bukowski RM, Figlin RA, Hutson TE, Michaelson MD, Kim ST, Baum CM and Kattan MW: Prognostic nomogram for sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer.* 113: 1552-8, 2008.
69. Crepel M, Escudier B, Machiels J, Staehler M, Ravaud A, Gravis G, Joly F, Chevreau C, Zini L, Lang H et al.: Comparison of two major prognostic models for patients with metastatic renal cell carcinoma treated in the contemporary era of targeted therapies. *J Clin Oncol.* 29(suppl): Abstract 4660, 2011.

70. Lara PNJ and Jonasch E: *Kidney Cancer: Principles and Practice*. Berlin Heidelberg, Springer, 2012.
71. Rübber H: *Uroonkologie*. Heidelberg, Springer Medizin Verlag, 2007.
72. Flanigan RC, Mickisch G, Sylvester R, Tangen C, Van Poppel H and Crawford ED: Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis. *J Urol*. 171: 1071-6, 2004.
73. Polcari AJ, Gorbonos A, Milner JE and Flanigan RC: The role of cytoreductive nephrectomy in the era of molecular targeted therapy. *Int J Urol*. 16: 227-33, 2009.
74. Patard JJ, Pignot G, Escudier B, Eisen T, Bex A, Sternberg C, Rini B, Roigas J, Choueiri T, Bukowski R et al.: ICUD-EAU International Consultation on Kidney Cancer 2010: treatment of metastatic disease. *Eur Urol*. 60: 684-90, 2011.
75. ClinicalTrials.gov. A service of the U.S. National Institutes of Health. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00930033>. Accessed January 25th, 2014., 2014.
76. Alt AL, Boorjian SA, Lohse CM, Costello BA, Leibovich BC and Blute ML: Survival after complete surgical resection of multiple metastases from renal cell carcinoma. *Cancer*. 117: 2873-82, 2011.
77. Breau RH and Blute ML: Surgery for renal cell carcinoma metastases. *Curr Opin Urol*. 20: 375-81, 2010.
78. Fosså SD, Kjølheth I and Lund G: Radiotherapy of metastases from renal cancer. *Eur Urol*. 8: 340-2, 1982.
79. Yagoda A, Abi-Rached B and Petrylak D: Chemotherapy for advanced renal-cell carcinoma: 1983-1993. *Semin Oncol*. 22: 42-60, 1995.
80. Parton M, Gore M and Eisen T: Role of cytokine therapy in 2006 and beyond for metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol*. 24: 5584-92, 2006.
81. Escudier B: Signaling inhibitors in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer J*. 14: 325-9, 2008.
82. Montmayeur JP, Valius M, Vandenhede J and Kazlauskas A: The platelet-derived growth factor beta receptor triggers multiple cytoplasmic signaling cascades that arrive at the nucleus as distinguishable inputs. *J Biol Chem*. 272: 32670-8, 1997.
83. Castellano E and Downward J: RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer*. 2: 261-74, 2011.
84. Chian R, Young S, Danilkovitch-Miagkova A, Rönstrand L, Leonard E, Ferrao P, Ashman L and Linnekin D: Phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the transformation of hematopoietic cells by the D816V c-Kit mutant. *Blood*. 98: 1365-73, 2001.
85. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/FLT3ID144.html>. Accessed November 10th, 2011.
86. Chen W, Drakos E, Grammatikakis I, Schlette EJ, Li J, Leventaki V, Staikou-Drakopoulou E, Patsouris E, Panayiotidis P, Medeiros LJ et al.: mTOR signaling is activated by FLT3 kinase and promotes survival of FLT3-mutated acute myeloid leukemia cells. *Mol Cancer*. 9: 292, 2010.
87. Potti A and George DJ: Tyrosine kinase inhibitors in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 10: 6371S-6S, 2004.

88. Allory Y, Culine S and de la Taille A: Kidney cancer pathology in the new context of targeted therapy. *Pathobiology*. 78: 90-8, 2011.
89. Patel PH, Chadalavada RS, Chaganti RS and Motzer RJ: Targeting von Hippel-Lindau pathway in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 12: 7215-20, 2006.
90. Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, Chevreau C, Filipek M, Melichar B, Bajetta E et al.: Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet*. 370: 2103-11, 2007.
91. Bukowski RM, Kabbinavar FF, Figlin RA, Flaherty K, Srinivas S, Vaishampayan U, Drabkin HA, Dutcher J, Ryba S, Xia Q et al.: Randomized phase II study of erlotinib combined with bevacizumab compared with bevacizumab alone in metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol*. 25: 4536-41, 2007.
92. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST et al.: Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 356: 115-24, 2007.
93. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Pili R, Bjarnason GA et al.: Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 27: 3584-90, 2009.
94. Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J, Szczylik C, Lee E, Wagstaff J, Barrios CH, Salman P, Gladkov OA, Kavina A et al.: Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol*. 28: 1061-8, 2010.
95. Larkin JM and Eisen T: Kinase inhibitors in the treatment of renal cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 60: 216-26, 2006.
96. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA et al.: Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 356: 125-34, 2007.
97. Pantuck AJ, Zeng G, Belldegrun AS and Figlin RA: Pathobiology, prognosis, and targeted therapy for renal cell carcinoma: exploiting the hypoxia-induced pathway. *Clin Cancer Res*. 9: 4641-52, 2003.
98. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I et al.: Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 356: 2271-81, 2007.
99. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grünwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N et al.: Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma : final results and analysis of prognostic factors. *Cancer*. 116: 4256-65, 2010.
100. Kramer MW, Merseburger AS, Peters I, Waalkes S and Kuczyk MA: [Systemic and surgical management of metastatic renal cell carcinoma.]. *Urologe A*, 2011.
101. Uniprot.org. <http://www.uniprot.org/uniprot/P35222>. Accessed 2012-09-07.

102. Choi HJ, Huber AH and Weis WI: Thermodynamics of beta-catenin-ligand interactions: the roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity. *J Biol Chem.* 281: 1027-38, 2006.
103. Valenta T, Hausmann G and Basler K: The many faces and functions of β -catenin. *EMBO J.* 31: 2714-36, 2012.
104. Heuberger J and Birchmeier W: Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2: a002915, 2010.
105. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D and Nusse R: The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell.* 50: 649-57, 1987.
106. Franch-Marro X, Wendler F, Griffith J, Maurice MM and Vincent JP: In vivo role of lipid adducts on *Wingless*. *J Cell Sci.* 121: 1587-92, 2008.
107. Cadigan KM and Nusse R: Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 11: 3286-305, 1997.
108. Veeman MT, Axelrod JD and Moon RT: A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell.* 5: 367-77, 2003.
109. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A and Kemler R: beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16: 3797-804, 1997.
110. Fiedler M, Mendoza-Topaz C, Rutherford TJ, Mieszczanek J and Bienz M: Dishevelled interacts with the DIX domain polymerization interface of Axin to interfere with its function in down-regulating β -catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 1937-42, 2011.
111. Daniels DL and Weis WI: Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol.* 12: 364-71, 2005.
112. The Wnt-Homepage. <http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>. Accessed 2012-09-06.
113. Clevers H: Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 127: 469-80, 2006.
114. Clevers H and Nusse R: Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease. *Cell.* 149: 1192-205, 2012.
115. MacDonald BT, Tamai K and He X: Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 17: 9-26, 2009.
116. Taurin S, Sandbo N, Qin Y, Browning D and Dulin NO: Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 281: 9971-6, 2006.
117. Du C, Zhang C, Li Z, Biswas MH and Balaji KC: Beta-catenin phosphorylated at threonine 120 antagonizes generation of active beta-catenin by spatial localization in trans-Golgi network. *PLoS One.* 7: e33830, 2012.
118. Maher MT, Mo R, Flozak AS, Peled ON and Gottardi CJ: Beta-catenin phosphorylated at serine 45 is spatially uncoupled from beta-catenin phosphorylated in the GSK3 domain: implications for signaling. *PLoS One.* 5: e10184, 2010.

119. Janssens N, Andries L, Janicot M, Perera T and Bakker A: Alteration of frizzled expression in renal cell carcinoma. *Tumour Biol.* 25: 161-71, 2004.
120. Togashi A, Katagiri T, Ashida S, Fujioka T, Maruyama O, Wakumoto Y, Sakamoto Y, Fujime M, Kawachi Y, Shuin T et al.: Hypoxia-inducible protein 2 (HIG2), a novel diagnostic marker for renal cell carcinoma and potential target for molecular therapy. *Cancer Res.* 65: 4817-26, 2005.
121. Sansom OJ, Griffiths DF, Reed KR, Winton DJ and Clarke AR: Apc deficiency predisposes to renal carcinoma in the mouse. *Oncogene.* 24: 8205-10, 2005.
122. Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K et al.: TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell.* 126: 955-68, 2006.
123. Peruzzi B, Athauda G and Bottaro DP: The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product represses oncogenic beta-catenin signaling in renal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 14531-6, 2006.
124. Chitalia VC, Foy RL, Bachschmid MM, Zeng L, Panchenko MV, Zhou MI, Bharti A, Seldin DC, Lecker SH, Dominguez I et al.: Jade-1 inhibits Wnt signalling by ubiquitylating beta-catenin and mediates Wnt pathway inhibition by pVHL. *Nat Cell Biol.* 10: 1208-16, 2008.
125. Choi H, Chun YS, Kim TY and Park JW: HIF-2alpha enhances beta-catenin/TCF-driven transcription by interacting with beta-catenin. *Cancer Res.* 70: 10101-11, 2010.
126. Kojima T, Shimazui T, Hinotsu S, Joraku A, Oikawa T, Kawai K, Horie R, Suzuki H, Nagashima R, Yoshikawa K et al.: Decreased expression of CXXC4 promotes a malignant phenotype in renal cell carcinoma by activating Wnt signaling. *Oncogene.* 28: 297-305, 2009.
127. Ueno K, Hirata H, Majid S, Tabatabai ZL, Hinoda Y and Dahiya R: IGFBP-4 activates the Wnt/beta-catenin signaling pathway and induces M-CAM expression in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer.* 129: 2360-9, 2011.
128. Urakami S, Shiina H, Enokida H, Hirata H, Kawamoto K, Kawakami T, Kikuno N, Tanaka Y, Majid S, Nakagawa M et al.: Wnt antagonist family genes as biomarkers for diagnosis, staging, and prognosis of renal cell carcinoma using tumor and serum DNA. *Clin Cancer Res.* 12: 6989-97, 2006.
129. Majid S, Saini S and Dahiya R: Wnt signaling pathways in urological cancers: past decades and still growing. *Mol Cancer.* 11: 7, 2012.
130. Hsu RJ, Ho JY, Cha TL, Yu DS, Wu CL, Huang WP, Chu P, Chen YH, Chen JT and Yu CP: WNT10A plays an oncogenic role in renal cell carcinoma by activating WNT/ β -catenin pathway. *PLoS One.* 7: e47649, 2012.
131. Kim YS, Kang YK, Kim JB, Han SA, Kim KI and Paik SR: beta-catenin expression and mutational analysis in renal cell carcinomas. *Pathol Int.* 50: 725-30, 2000.
132. Bilim V, Kawasaki T, Katagiri A, Wakatsuki S, Takahashi K and Tomita Y: Altered expression of beta-catenin in renal cell cancer and transitional

- cell cancer with the absence of beta-catenin gene mutations. *Clin Cancer Res.* 6: 460-6, 2000.
133. Aaltomaa S, Lipponen P, Kärjä V, Lundstedt S, Lappi J and Kosma VM: The expression and prognostic value of alpha-, beta- and gamma-catenins in renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 24: 2407-13, 2004.
134. Bruder E, Moch H, Ehrlich D, Leuschner I, Harms D, Argani P, Briner J, Graf N, Selle B, Ruffle A et al.: Wnt signaling pathway analysis in renal cell carcinoma in young patients. *Mod Pathol.* 20: 1217-29, 2007.
135. Ronkainen H, Kauppila S, Hirvikoski P and Vaarala MH: Evaluation of myosin VI, E-cadherin and beta-catenin immunostaining in renal cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 29: 2, 2010.
136. Lian X, Duan X, Wu X, Li C, Chen S, Wang S, Cai Y and Weng Z: Expression and clinical significance of von Hippel-Lindau downstream genes: Jade-1 and β -catenin related to renal cell carcinoma. *Urology.* 80: 485.e7-13, 2012.
137. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G and Kallioniemi OP: Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 4: 844-7, 1998.
138. Merseburger AS, Hennenlotter J, Schilling D, Sievert KD, Küfer R and Kuczyk MA: [Application of tissue microarrays for the diagnosis, prognosis and therapeutic decision making in renal cell carcinoma]. *Urologe A.* 45: 323-4, 326-7, 2006.
139. Bildquelle: http://www.alphamatrix.de/images/mta1_geraet.jpg.
140. Harms V: Biomathematik, Statistik und Dokumentation: Eine leichtverständliche Einführung; nach den Gegenstandskatalogen für den 1. und 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung. Kiel, Harms Verlag, 1998.
141. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S and Hedge P: Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science.* 253: 665-9, 1991.
142. Kobayashi M, Honma T, Matsuda Y, Suzuki Y, Narisawa R, Ajioka Y and Asakura H: Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 82: 1689-93, 2000.
143. Klaus A and Birchmeier W: Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer.* 8: 387-98, 2008.
144. Park JY, Park WS, Nam SW, Kim SY, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY and Park CK: Mutations of beta-catenin and AXIN 1 genes are a late event in human hepatocellular carcinogenesis. *Liver Int.* 25: 70-6, 2005.
145. Polakis P: Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 14: 1837-51, 2000.
146. Lu J, Ma Z, Hsieh JC, Fan CW, Chen B, Longgood JC, Williams NS, Amatruda JF, Lum L and Chen C: Structure-activity relationship studies of small-molecule inhibitors of Wnt response. *Bioorg Med Chem Lett.* 19: 3825-7, 2009.
147. Janssens N, Janicot M and Perera T: The Wnt-dependent signaling pathways as target in oncology drug discovery. *Invest New Drugs.* 24: 263-80, 2006.
148. Hirata H, Hinoda Y, Nakajima K, Kawamoto K, Kikuno N, Ueno K, Yamamura S, Zaman MS, Khatri G, Chen Y et al.: Wnt antagonist DKK1

- acts as a tumor suppressor gene that induces apoptosis and inhibits proliferation in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 128: 1793-803, 2011.
149. Hirata H, Hinoda Y, Nakajima K, Kawamoto K, Kikuno N, Kawakami K, Yamamura S, Ueno K, Majid S, Saini S et al.: Wnt antagonist gene DKK2 is epigenetically silenced and inhibits renal cancer progression through apoptotic and cell cycle pathways. *Clin Cancer Res*. 15: 5678-87, 2009.
 150. Ueno K, Hirata H, Majid S, Chen Y, Zaman MS, Tabatabai ZL, Hinoda Y and Dahiya R: Wnt antagonist DICKKOPF-3 (Dkk-3) induces apoptosis in human renal cell carcinoma. *Mol Carcinog*. 50: 449-57, 2011.
 151. Kawakami K, Hirata H, Yamamura S, Kikuno N, Saini S, Majid S, Tanaka Y, Kawamoto K, Enokida H, Nakagawa M et al.: Functional significance of Wnt inhibitory factor-1 gene in kidney cancer. *Cancer Res*. 69: 8603-10, 2009.
 152. Zhu W, Shiojima I, Ito Y, Li Z, Ikeda H, Yoshida M, Naito AT, Nishi J, Ueno H, Umezawa A et al.: IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature*. 454: 345-9, 2008.
 153. Maestro ML, del Barco V, Sanz-Casla MT, Moreno J, Adrover E, Izquierdo L, Zanna I, Fernández C, Redondo E, Blanco J et al.: Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in renal cancer. *Oncology*. 59: 126-30, 2000.
 154. Anastas JN and Moon RT: WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer*. 13: 11-26, 2013.

7. Danksagung

an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. J. Bedke für die Überlassung des Themas und die kompetente, geduldige Betreuung. Ebenso für die Integration ins Team der Klinik für Urologie, die Hilfe bei der Konzeption und Planung meiner Arbeit, sowie die vielen Ratschläge bei der Erstellung meiner Dissertation.

an Herrn PD Dr. med. S. Kruck für seine Unterstützung bei der Auswahl des Kollektivs, der Erstellung der Tissue Micro Arrays am Institut für klinische Pharmakologie (IKP) in Stuttgart und der statistischen Auswertung bzw. Aufarbeitung meiner Daten.

an Herrn Dr. med. M. Scharpf für die Hilfe bei der aufwändigen Beurteilung und Auswahl der histologischen Schnitte, für die kompetente Betreuung der Immunhistochemie und seine Geduld für meine detaillierten Fragen.

an die Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. A. Stenzl für die Betreuung und die Überlassung verschiedenster Ressourcen.

an das Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen, Abteilung für Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. F. Fend für die gute Zusammenarbeit, den Zugang zum Archiv, die Überlassung der zahlreichen Gewebeproben als Grundlage für meine Arbeit, sowie die unkomplizierte Erlaubnis zur Nutzung verschiedenster Ressourcen.

an das IKP Stuttgart unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. M. Schwab und seine Mitarbeiter für die freundliche Aufnahme und die Unterstützung beim

Danksagung

Erstellen der Tissue Micro Arrays und die Überlassung der benötigten Gerätschaften.

an meine Eltern, die mir ein sorgenfreies Aufwachsen und eine hervorragende Ausbildung durch ihre liebevolle Unterstützung ermöglicht haben.

an Rebekka für ihre Liebe, den Rückhalt und die Geduld. Ohne Dich wäre all dies nicht möglich gewesen!